



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2009**

Departamento de Biologia

**MARIA TERESA DE  
SOUSA COELHO  
CORTEZ**

**ABORDAGEM MOLECULAR NA RESOLUÇÃO DE  
PROBLEMAS COM BIOCORROSÃO**



**MARIA TERESA DE  
SOUSA COELHO  
CORTEZ**

**ABORDAGEM MOLECULAR NA RESOLUÇÃO DE  
PROBLEMAS COM BIOCORROSÃO**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Oliveira, Investigadora em Pós-Doutoramento do CESAM e do Professor Doutor António Carlos Matias Correia, Professor Associado com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **o júri**

presidente

**Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

**Doutora Cláudia Sofia Soares de Oliveira**

investigadora em Pós-Doc do CESAM, Universidade de Aveiro (orientadora)

**Doutor António Carlos Matias Correia**

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (co-orientador)

**Doutor José Paulo Jesus Rainho**

investigador auxiliar da Unidade de Transferência de Tecnologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de várias formas, tornaram possível a realização deste trabalho.

Em primeiro lugar, à Professora Doutora Cláudia Oliveira, pela sua orientação científica e por ter acreditado neste trabalho.

A todos os professores do Mestrado pelos conhecimentos transmitidos, que me serão úteis ao longo da minha vida pessoal e profissional.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e reconhecimento que me deram ao longo de toda a vida .

Um agradecimento muito especial ao Celso pelo permanente estímulo e disponibilidade para me ouvir e me ajudar de forma preciosa.

## palavras-chave

bactérias redutoras do sulfato; biorremediação; biocorrosão; PCR-DGGE; PCR em tempo real; hibridação *in situ* por fluorescência.

## resumo

O desenvolvimento de uma abordagem molecular mais recente, na detecção, identificação e quantificação de microrganismos, levou a que novos serviços tenham vindo a ser disponibilizados e possam mais eficazmente contribuir para a resolução de diversos problemas em microbiologia. As metodologias moleculares, como a PCR-DGGE, a PCR em tempo real e o FISH, sendo métodos de análise microbiológica poderosos no que diz respeito à sensibilidade e rapidez, permitem a identificação e monitorização mais eficaz dos microrganismos responsáveis por determinado processo, apresentando inúmeras vantagens sobre os métodos não moleculares. Recorrendo à utilização destas metodologias os laboratórios podem encontrar novas oportunidades de negócio na prestação de serviços às indústrias que pretendem resolver problemas causados por bactérias redutoras do sulfato (SRB).

Para se entender a dimensão dos problemas industriais relacionados com as SRB começou-se por investigar o papel deste grupo de bactérias na microbiologia ambiental e industrial, bem como a sua intervenção nos processos de biorremediação de esgotos industriais e municipais e nos fenómenos de biocorrosão de equipamentos. A sua participação nestes processos justifica a importância do seu estudo e inclusivamente a procura de soluções para resolver os problemas causados nas indústrias.

Posteriormente, fez-se uma análise das vantagens e desvantagens de três tipos de abordagens moleculares de detecção de microrganismos (PCR-DGGE, PCR em tempo real e FISH), de forma a avaliar o seu potencial de aplicação no estudo da diversidade de SRB em diversos ambientes. Passou-se depois, ao estudo e análise de três casos relacionados com a detecção e quantificação de SRB. Nesta perspectiva, os métodos baseados na PCR-DGGE, na PCR em tempo real e na análise FISH demonstram potencial de aplicação no estudo da diversidade de SRB em diversos ambientes, como se encontra documentado em vários artigos de referência e, como tal, podem contribuir para um crescimento dos negócios em laboratórios de microbiologia que os apliquem. Apesar disso, depois da análise efectuada, concluiu-se que a PCR em tempo real ainda apresenta algumas desvantagens, sobretudo em termos de rapidez, comparando com os resultados que disponibiliza.

Por fim, foram sugeridas três hipóteses de negócio, na resolução de problemas industriais concretos relacionados com as SRB, com o contributo dos métodos moleculares. O crescimento deste tipo de negócios ao nível dos laboratórios, associado ao desenvolvimento da abordagem molecular na microbiologia, enquadra-se no espírito bioempreendedor que se vive em Portugal e um pouco por todo o mundo.

**keywords**

sulphate reducing bacteria; bioremediation; biocorrosion; PCR-DGGE; real-time PCR; fluorescence in situ hybridization.

**abstract**

The development of a more recent molecular approach, in microorganisms' detection, identification and quantification has released new services that may contribute more effectively to solve various problems in microbiology. The molecular methodologies, such as the PCR-DGGE, the real-time PCR and the FISH, being powerful microbiological methods with regard to the sensitivity and speed, allow a more effective identification and monitoring of the microorganisms responsible for specific processes, providing many advantages over the non molecular methods. Using these methodologies the laboratories can find new business opportunities in providing services to industries wishing to solve problems caused by sulphate reducing bacteria (SRB).

To understand the scale of the industrial problems related to SRB, the role of this group of microorganisms in environmental and industrial microbiology was investigated, as well as its intervention in industrial and municipal sewage bioremediation and in equipment biocorrosion. Their involvement in these processes justifies the importance of these studies, including the search for solutions to solve the problems caused to the industries.

Subsequently, we have analysed the advantages and disadvantages of three types of molecular approaches in microorganisms detection (PCR-DGGE, real-time PCR and FISH), in order to evaluate their potential for application in the study of the SRB diversity in various environments. Then we studied and analysed three case studies relating to the SRB detection and quantification. In this respect, methods based on PCR-DGGE, real-time PCR and FISH analysis showed potential application in the study of the SRB diversity in various environments, as it is documented in several reference articles and thus, can contribute to a business growth in microbiology laboratories that use them. Nevertheless, after the analysis, it was concluded that the real-time PCR still has some disadvantages, especially in terms of speed, compared to the results that offer.

Finally, three business opportunities for specific industrial SRB related problems, with the contribution of molecular methods were suggested.

The growth of this type of business at the laboratories level, associated with the development of molecular approaches in microbiology, falls within the bioentrepreneurship spirit in Portugal and throughout the world.

# Índice

<b>Índice de Tabelas</b>	8
<b>Índice de Figuras</b>	9
<b>1 Introdução</b>	11
1.1 Empreendedorismo – definição e factores	11
1.2 Ambiente empreendedor em Portugal – análise SWOT	16
<b>2 Objectivos</b>	28
<b>3 Bactérias Redutoras de Sulfato (SRB)</b>	29
3.1 Ecologia e filogenia das SRB	29
3.2 Papel das SRB na microbiologia ambiental e industrial	35
3.3 SRB e biocorrosão	37
3.3.1 Corrosão	37
3.3.2 Biocorrosão	38
<b>4 Métodos de Detecção e Quantificação de SRB</b>	44
4.1 Métodos clássicos e métodos moleculares	44
4.2 Métodos moleculares indirectos	46
4.2.1 Métodos moleculares independentes do cultivo baseados na tecnologia PCR ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )	46
4.2.1.1 Extracção e purificação do DNA	47
4.2.1.2 Amplificação por PCR	48
4.2.1.3 Análise dos produtos PCR	51
4.2.1.4 Sequenciação de DNA	52
4.2.1.5 Bibliotecas de rDNA 16S	53
4.2.1.6 DGGE ( <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> ) e TGGE ( <i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i> )	55
4.2.1.7 Sondas de ácidos nucleicos	57
4.2.2 <i>Real-time</i> PCR	58
4.3 Métodos moleculares directos	60
4.3.1 FISH ( <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> )	60

<b>5 Casos de Estudo de Detecção e Quantificação de SRB</b>	63
5.1 Abordagem <i>nested</i> -PCR-DGGE para determinar a diversidade de SRB em comunidades microbianas complexas (Dar <i>et al.</i> , 2005)	64
5.2 Detecção e quantificação de SRB em esgotos industriais salinos de diversas indústrias químicas por <i>real-time</i> PCR (Ben-Dov <i>et al.</i> , 2007)	73
5.3 Estudo da dominância relativa de SRB seleccionadas, num biorreactor contínuo, por FISH (Icgen <i>et al.</i> , 2006)	84
5.4 Análise comparativa dos tempos de resposta dos métodos moleculares	94
<b>6 Aplicações com o Contributo dos Métodos Moleculares</b>	98
6.1 Situação 1 - corrosão numa conduta de resfriamento de uma indústria	98
6.2 Situação 2 - contributo para a resolução de problemas de corrosão provocados por SRB	101
6.3 Situação 3 - biorremediação em estações de tratamento de águas residuais <i>versus</i> corrosão nas condutas	104
<b>7 Considerações Finais e Perspectivas Futuras</b>	107
7.1 Considerações finais	107
7.2 Perspectivas futuras	114
<b>8 Bibliografia</b>	115



# Índice de Tabelas

## Capítulo 1 – Introdução

Tabela 1.1 - Características de um empreendedor	12
Tabela 1.2 - Perfil do empreendedor português em 2006	12
Tabela 1.3 - Diferenças entre a “velha economia” e a “nova economia”	13
Tabela 1.4 - Análise SWOT do empreendedorismo em Portugal	19
Tabela 1.5 - Estruturas de apoio ao empreendedorismo em Portugal e até 2007	22
Tabela 1.6 - Parques tecnológicos associados à biotecnologia no ano de 2006 em Portugal, organizados por localização e por ano de criação	25

## Capítulo 3 – Bactérias Redutoras de Sulfato (SRB)

Tabela 3.1 - Grupos filogenéticos e algumas características de SRB	31
--	----

## Capítulo 5 – Casos de Estudo de Detecção e Quantificação de SRB

Tabela 5.1 - <i>Primers</i> PCR e programa usados no estudo de Dar <i>et al.</i> (2005)	66
Tabela 5.2 - <i>Primers</i> para PCR utilizados no estudo de Ben-Dov <i>et al.</i> (2007)	76
Tabela 5.3 - <i>Primers</i> para <i>real-time</i> PCR utilizados no estudo de Ben-Dov <i>et al.</i> (2007)	79
Tabela 5.4 - Sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S usadas no estudo de Içgen <i>et al.</i> , 2006	87
Tabela 5.5 - Abundância da população de SRB no biorreactor anaeróbio (Içgen <i>et al.</i> , 2006)	89
Tabela 5.6 – Comparação de três métodos moleculares no que diz respeito ao equipamento base requerido, etapas, tempos de resposta, aplicações e inconvenientes	96

# Índice de Figuras

## Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.1 - Comparação da actividade empreendedora por país em 2001 e 2004	17
---	----

## Capítulo 3 – Bactérias Redutoras de Sulfato (SRB)

Figura 3.1 - Ciclo do enxofre	29
-------------------------------	----

## Capítulo 4 – Métodos de Detecção e Quantificação de SRB

Figura 4.1 - Métodos moleculares baseados no PCR para a identificação de microrganismos	46
Figura 4.2 - Esquema de um ciclo de amplificação de DNA por PCR	49

## Capítulo 5 – Casos de Estudo de Detecção e Quantificação de SRB

Figura 5.1 - Esquema experimental da amplificação do gene do rRNA 16S de SRB de amostras ambientais	67
Figura 5.2 - Esquema experimental da análise da diversidade de SRB por DGGE	68
Figura 5.3 - Esquema experimental da determinação do sulfureto e da quantificação de SRB pelo MPN	74
Figura 5.4 - Esquema experimental da amplificação dos genes <i>dsrAB</i> e <i>apsA</i> de SRB de amostras ambientais e construção da biblioteca de clones	75
Figura 5.5 - Esquema experimental da análise <i>real-time</i> PCR e desenvolvimento de curvas padrão (A) e quantificação de SRB por <i>real-time</i> PCR com detecção <i>SYBRGreen</i> das amostras ambientais (B)	78
Figura 5.6 - Evolução sazonal de SRBs nos esgotos industriais altamente salinos	80
Figura 5.7 - Esquema experimental da análise FISH da diversidade e da estrutura da comunidade de SRBs num biorreactor anaeróbio contínuo	86
Figura 5.8 - Abundância da população de SRB no biorreactor anaeróbio	88

## **Capítulo 6 – Aplicações com o Contributo dos Métodos Moleculares**

Figura 6.1 - Tubagem de conduta de resfriamento evidenciando corrosão	98
Figura 6.2 - Pontos de amostragem ao longo de uma conduta evidenciando corrosão	99
Figura 6.3 - Esquema experimental da análise da diversidade microbiana por PCR-DGGE (uma etapa)	100
Figura 6.4 - Esquema experimental da análise da diversidade de SRB por <i>nested</i> -PCR-DGGE (duas etapas)	103
Figura 6.5 - Esquema experimental da análise FISH da diversidade e a estrutura da comunidade de SRBs em amostras de águas residuais submetidas a diferentes condições de biorremediação	105

# 1 Introdução

## 1.1 Empreendedorismo – definição e factores

A instável situação económica mundial faz com que o empreendedorismo assuma, actualmente, uma grande pertinência. Em vários locais do mundo, assiste-se a situações de pessoas desempregadas que vão à procura das necessidades do mercado, recém licenciados que tentam inovar recorrendo a conhecimentos adquiridos durante a licenciatura ou pessoas que, pela sua postura, são portadoras de um espírito empreendedor. Estes indivíduos têm capacidade para tomar iniciativas, encontrar soluções para problemas económicos ou sociais, através da transformação de uma ideia num produto ou serviço, mediante uma atitude de assumpção de riscos e inovação.

De acordo com um comunicado da Comissão Europeia, empreendedorismo é “um processo dinâmico a partir do qual indivíduos identificam sistematicamente oportunidades económicas, e respondem às mesmas, desenvolvendo, produzindo e vendendo bens e serviços. Este processo requer qualidades como autoconfiança, capacidade para assumir riscos e sentido de envolvimento pessoal”. (Comissão Europeia, 1998).

Nesta tese pretende-se falar sobretudo do empreendedorismo e da criação de novos negócios e oportunidades associados à Microbiologia. Desta forma, tem também que se definir bioempreendedorismo como sendo a criação de ideias, projectos, negócios e empresas utilizando o conhecimento científico e a biotecnologia.

A par da definição de empreendedorismo apresenta-se também a definição do que é um empreendedor e quais as características e perfil que este deve ter. “ O empreendedor é aquele que destrói a ordem económica existente através da introdução de novos produtos e serviços, pela criação de novas formas, ou pela exploração de novos recursos e materiais” (Schumpeter, 1942). Grande parte do sucesso dos projectos, empresas e negócios depende muito do perfil do empreendedor em termos de personalidade, competências e experiência.

Nas Tabelas 1.1 e 1.2, encontram-se resumidas, respectivamente, as principais características de um empreendedor e dados relacionados com o perfil do empreendedor português em 2006.

**Tabela 1.1 – Características de um empreendedor, adaptado de Instituto de Desenvolvimento e Inovação (actualizado em 2007).**

<b>Características de um empreendedor</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Visão e sentido de oportunidade</li> <li>■ Ambição e determinação</li> <li>■ Autoconfiança e optimismo</li> <li>■ Pragmatismo para transformar uma ideia ou visão de um negócio, num projecto concreto</li> <li>■ Capacidade de tomada de decisão em tempo oportuno, aliada à rapidez de implementação da decisão</li> <li>■ Capacidade de trabalho e dinamismo</li> <li>■ Coragem e capacidade de arriscar, não demonstrando medo pelo fracasso</li> <li>■ Sentido de responsabilidade e capacidade para aceitar responsabilidades legais, morais e sociais associadas aos seus projectos</li> <li>■ Curiosidade e criatividade, apostando na inovação</li> <li>■ Sentido de liderança, organizando recursos humanos, técnicos, materiais e financeiros e criando uma filosofia e método de trabalho e sabendo delegar responsabilidades, mantendo o controlo do negócio.</li> <li>■ Facilidade de comunicação com as pessoas – construção de uma rede de contactos (<i>networking</i>) que os auxiliam nos ambientes interno e externo da empresa</li> <li>■ Experiência pessoal, escolar e profissional e conhecimento do negócio que idealizou</li> </ul>
---	--

**Tabela 1.2 – Perfil do empreendedor português em 2006, adaptado de Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação, 2007.**

<b>Idade</b>	■ Média de 37 anos
<b>Género</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Masculino: 65,6 %</li> <li>■ Feminino: 34,4%</li> </ul>
<b>Formação</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Primeiro ciclo do ensino básico – 9,6%</li> <li>■ Ensino básico – 20,9%</li> <li>■ Ensino secundário – 19,6%</li> <li>■ Curso médio ou formação técnica ou profissional – 8,3%</li> <li>■ Frequência universitária ou bacharelato – 13,2%</li> <li>■ Licenciatura – 22,6%</li> <li>■ Pós-graduação, mestrado ou doutoramento – 6,1%</li> </ul>
<b>Situação profissional anterior</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Empresário em nome individual ou numa sociedade – 32,7%</li> <li>■ Trabalhador por conta de outrem – 32,1%</li> <li>■ Desempregado – 14,7%</li> <li>■ Profissional liberal – 9,2%</li> <li>■ Outros – 11,3%</li> </ul>
<b>Negócio</b>	■ Escolha prioritária do sector de serviços (42,2%)
<b>Sociedade</b>	■ Micro-empresa (máximo dois sócios ligados por laços familiares)
<b>Motivações</b>	■ Procura de uma situação económica estável; Aproveitar uma oportunidade; Desejo de criatividade, inovação e independência e necessidade de realização pessoal

O ambiente empreendedor vivido em Portugal, na Europa e no resto do mundo, foi despoletado por inúmeros factores. A escassez de emprego, as mudanças na economia, a globalização, o incentivo à inovação e ao desenvolvimento tecnológico e ainda o aparecimento de novas tecnologias e o avanço no conhecimento científico são alguns desses factores (Baptista *et al.*, 2005).

Os elevados níveis de **desemprego** e o fraco crescimento económico que atingem Portugal e outros países da Europa levaram a que os governos passassem, sobretudo a partir da década de 90, a encarar o auto-emprego e o empreendedorismo como forma de promover o crescimento e reduzir o desemprego (Baptista *et al.*, 2005 e Jorge Nascimento Rodrigues (actualizado em 2005)). Foram assim criados sistemas e programas de incentivo ao empreendedorismo, que actualmente proliferam por toda a Europa.

Por outro lado, em grande parte dos países, a **economia** tem mudado drasticamente. Segundo Drucker, «Assistimos a uma viragem profunda de uma economia de gestão de empresas e instituições para uma nova economia empreendedora.» (Drucker, 1993). De uma economia centrada na produção/manufatura, passou-se claramente para uma economia vocacionada para a prestação de serviços e baseada na informação, na qual é incentivado o empreendedorismo. Nesta “nova economia” os ciclos de vida para as tecnologias e produtos são curtos (Baptista *et al.*, 2005). Na Tabela 1.3, descrevem-se as principais diferenças entre estes dois tipos de economia.

**Tabela 1.3 – Diferenças entre a “velha economia” e a “nova economia”, adaptado de Baptista *et al.*, 2005.**

“Velha economia”	“Nova economia”
■ Baseados na gestão administrativa e nas economias de escala.	■ Baseados na inovação e no empreendedorismo e em novos modelos de negócios.
■ Os retornos são pequenos	■ Os retornos são superiores
■ Existem barreiras de entrada	■ Existem baixas barreiras de entrada
■ Os activos são sobretudo físicos e a unidade de produção são também os bens físicos (modelo económico baseado na manufatura)	■ Os activos são intelectuais incentivando-se o poder do conhecimento
■ Ciclos de vida longos para tecnologias e produtos	■ Ciclos de vida curtos para tecnologias e produtos
■ Há estabilidade dos mercados ■ Há a sobrevivência dos maiores ■ Empregos são seguros ■ Globalização das empresas e criação de multinacionais.	■ Diferenciação da procura e necessidade no crescimento dos serviços ■ Há sobrevivência dos mais rápidos
■ Economia cujo crescimento assenta nos mercados bolsistas.	■ Economia que conta com o capital de risco.

A **globalização**, que se traduz no crescimento da interdependência económica e social dos países e das suas populações, é também um factor para o desenvolvimento do empreendedorismo (Crafts, 2000).

A abertura da economia obriga os governos, as empresas e os cidadãos a estarem atentos ao que se passa no mundo, favorecendo uma maior competitividade que permite melhorar a relação qualidade/preço dos produtos e serviços, bem como diversificar produtos e tecnologias. Desta forma promove o empreendedorismo dentro das próprias organizações.

Actualmente a globalização faz-se também sentir ao nível da velocidade de divulgação e partilha da informação, bastando apenas alguns segundos para uma notícia qualquer cruzar o planeta. Através deste processo de globalização, realizam-se quase instantaneamente transacções financeiras e comerciais e espalham-se aspectos culturais por todo o planeta. O facto de sermos uma sociedade cada vez mais globalizada e informada, promove o aparecimento de novos problemas, como por exemplo, a disseminação de epidemias que estavam confinadas a países restritos ou o desenvolvimento de novas consciencializações sociais e ambientais, como a falta de recursos alimentares e energéticos agravada pelo crescimento demográfico, o aumento do efeito de estufa e das suas consequências negativas, etc. A análise destes novos problemas e as tentativas para os tentar resolver podem constituir novas oportunidades de negócio.

A **inovação e o desenvolvimento tecnológico** são importantes para o desenvolvimento económico dos países, não só pelas patentes registadas mas também pelo desafio que vêm constituir para as empresas já instaladas.

Em Portugal, a fraca competitividade e a baixa produtividade são ainda problemas que inibem o crescimento da economia. O *Global Competitiveness Index* 2008-2009, que compara a competitividade em vários países do mundo, coloca Portugal na 43ª posição global, relativamente ao índice de competitividade, representando uma descida de três lugares face ao ano anterior. Dentro da União Europeia, surge em 17º lugar, (Porter *et al.*, 2008). Ao nível do índice tecnológico, que mede a capacidade dos países para tirarem partido das tecnologias da informação e comunicação, como instrumentos para melhorar a competitividade do país, Portugal ocupa o 28º lugar do *Global Information Technology Report* 2007-2008 (Dutta *et al.*, 2007).

De acordo com o programa do XVII governo constitucional português (2005), o problema da falta de competitividade nacional tem que ser combatido através da inovação, quer ao nível dos processos, dos produtos e serviços e da tecnologia, como ao nível da inovação na organização e na gestão (Presidência do Conselho de Ministros, 2005). Para promover a inovação em Portugal, foi criado e aprovado em Conselho de Ministros, em Novembro de 2005, o Plano de Desenvolvimento Tecnológico que combina política de inovação, com políticas ambiciosas para a sociedade da informação, a ciência e a tecnologia, e a qualificação das pessoas.

O empreendedorismo surge ainda associado ao aparecimento de **novas tecnologias** e ao **avanço do conhecimento científico**.

Assiste-se a uma emergência cada vez mais rápida de novas tecnologias. Para a inovação científica, o desenvolvimento tecnológico é fulcral. Ciência e tecnologia tornaram-se elementos constitutivos da sociedade moderna, fazendo funcionar o sistema económico e social, daí que o poder político esteja tão interessado no controlo da ciência e da tecnologia. Não há ciência neutra, visto que esta precisa de apoios políticos e económicos para desenvolver a técnica que a ajuda a confirmar a hipótese e, por sua vez, as forças políticas e as outras instituições ganham poder com as descobertas científicas.

Um bom exemplo de como a tecnologia se tornou essencial para o desenvolvimento do empreendedorismo na área da Biologia foi o aparecimento do microscópio, que constituiu um instrumento preponderante para os biólogos descobrirem a unidade básica, funcional e morfológica dos seres vivos – a célula. A invenção do microscópio permitiu um aumento do objecto de estudo da área da Biologia, levando ao aparecimento de novos problemas e de novas soluções. Outro exemplo mais recente foi o avanço das tecnologias e técnicas de biologia celular e molecular que têm possibilitado o avanço do conhecimento em relação à Microbiologia, permitindo a evolução de uma abordagem fenotípica para uma abordagem molecular. Esta nova abordagem tem desencadeado novas oportunidades de negócio. Este assunto será desenvolvido posteriormente.



## 1.2 Ambiente empreendedor em Portugal – análise SWOT

Para melhor entender a dimensão da actividade empreendedora em Portugal torna-se útil fazer a comparação com outros países. Para auxiliar essa comparação, utilizar-se-ão dados presentes nos relatórios do *Global Entrepreneurship Monitor* (GEM) de 2001, primeiro ano em que Portugal fez parte deste estudo anual mundial (Reynolds *et al.*, 2001) e de 2004 (Acs *et al.*, 2005). O índice utilizado, a actividade empreendedora total (TEA), mede a quantidade de indivíduos activos implicados num novo negócio, sendo calculado de forma a reflectir o número de indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e os 64 anos envolvidos numa actividade empreendedora.

Em 2001, Portugal registou uma taxa de 7,1% relativamente à actividade empreendedora, ocupando o nono mais baixo nível de actividade empreendedora dos vinte e nove países participantes. Portugal era também dos países onde a percentagem de mulheres envolvidas na actividade empreendedora era mais baixa (Reynolds *et al.*, 2001).

Em 2004, a situação de Portugal piorou, sendo o quarto pior dos dezasseis países da União Europeia analisados nesse ano, com apenas 4% da população adulta (entre 18 e 64 anos) envolvida na criação de empresas, constituindo uma descida de mais de 3% relativamente a 2001. Este valor é claramente inferior à média do GEM 2004 (9,3%) (Acs *et al.*, 2005). Por outro lado, em contraste com 2001, verifica-se um maior equilíbrio relativamente ao género dos empreendedores, sendo que os empreendedores do sexo feminino representam 48%, um valor bastante superior aos 38% registados na média dos países GEM 2004 (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005).

Comparando os gráficos verifica-se também que, na generalidade, houve um decréscimo da actividade empreendedora entre 2001 e em 2004 nos restantes países da Europa enquanto que nos Estados Unidos a actividade empreendedora manteve-se semelhante e superior à da média europeia. É de notar ainda a existência de uma forte actividade empreendedora em alguns países da América do Sul e da África e Médio Oriente, sugerindo o crescimento destes novos mercados emergentes.

No gráfico da Figura 1.1 apresentam-se os resultados comparativos dos relatórios do GEM de 2001 e de 2004.

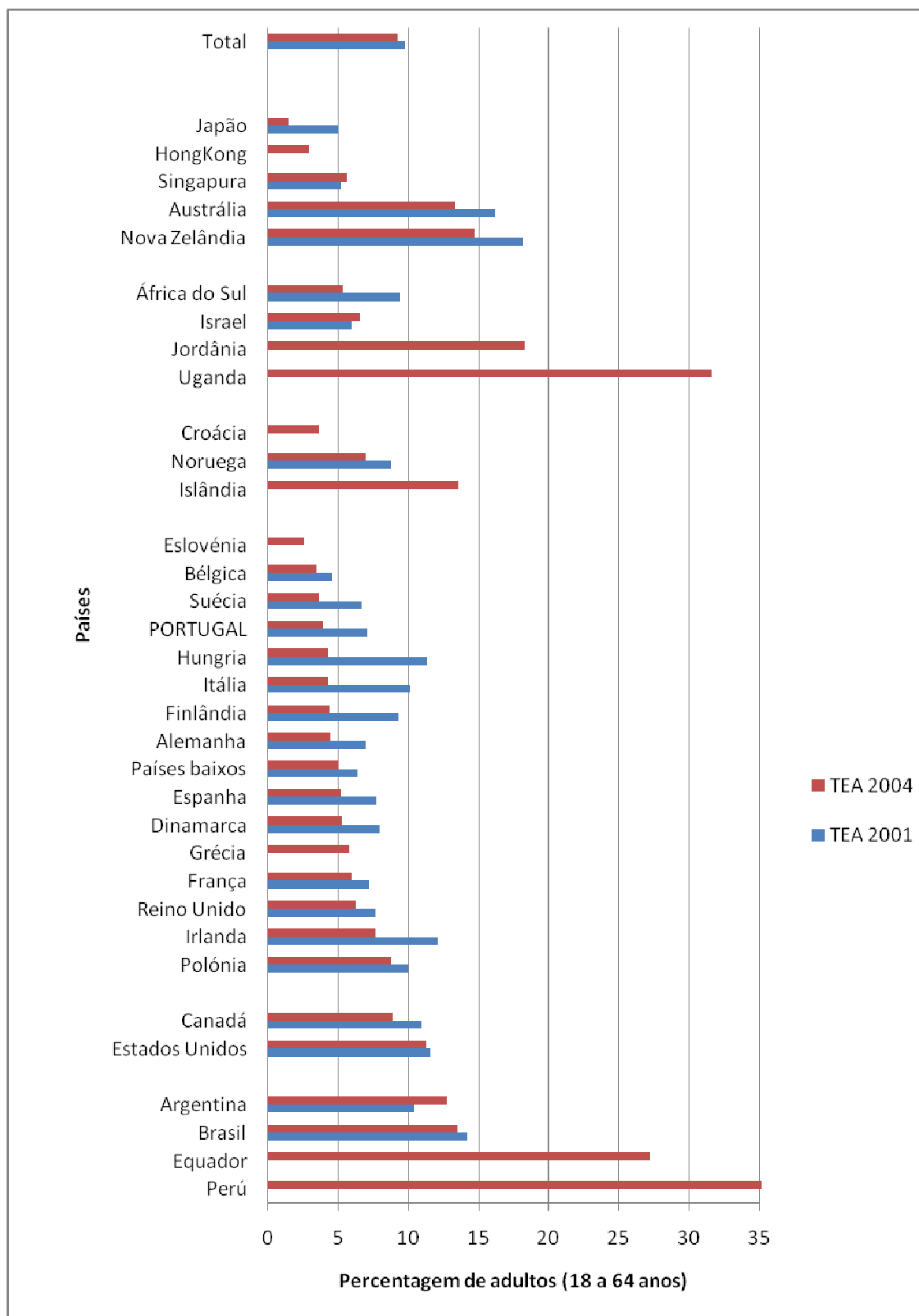


Figura 1.1 – Comparação da actividade empreendedora por país em 2001 e 2004 (Reynolds *et al.*, 2001 e Acs *et al.*, 2005).

Da análise do relatório GEM 2004 é ainda possível diferenciar a actividade empreendedora por necessidade, na qual se criam negócios por não haver outra alternativa e a actividade empreendedora por oportunidade, na qual há descoberta de uma oportunidade de negócio lucrativa. A actividade empreendedora induzida pela oportunidade predomina sobre a actividade empreendedora baseada na necessidade, na maioria dos países GEM 2004. Este padrão verifica-se também em Portugal, com 75% da actividade empreendedora nacional a ser induzida pelas oportunidades de mercado (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005).

Ainda de forma a entender o ambiente de empreendedorismo vivido em Portugal, utilizar-se-á uma análise SWOT. A análise SWOT (*Strengths* - Energias, *Weaknesses* - Debilidades, *Opportunities* – Oportunidades e *Threats* - Ameaças) é uma ferramenta utilizada para fazer o estudo do cenário ou ambiente, utilizado como base para gestão e planeamento estratégico de uma empresa (Silva, 2007). Esta análise de cenário divide-se em ambiente interno, determinado pela posição actual da empresa (Energias e Debilidades) e em ambiente externo, relacionado com antecipações do futuro (Oportunidades e Ameaças). O ambiente interno pode ser controlado pelos dirigentes da empresa, uma vez que é o resultado das estratégias de actuação definidas pelos próprios membros da organização. Desta forma, durante a análise, quando for percebido um ponto forte, ele deve ser ressaltado ao máximo e quando for percebido um ponto fraco, a organização deve agir para controlá-lo ou, pelo menos, minimizar o seu efeito. Já o ambiente externo está totalmente fora do controle da organização. Mas, apesar de não poder controlá-lo, a empresa deve conhecê-lo e monitorizá-lo com frequência de forma a aproveitar as oportunidades e evitar as ameaças.

Na Tabela 1.4 está representada uma análise SWOT do empreendedorismo em Portugal. Procurar-se-á analisar, do ponto de vista do empreendedor, sobretudo as energias, debilidades, oportunidades e ameaças associadas às empresas de Biotecnologia em Portugal.

Tabela 1.4 – Análise SWOT do empreendedorismo em Portugal.

	Ajuda	Perturba
Interna (Organização)	<p>S</p> <p><b>No Geral:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Existência de estruturas de I&amp;D (investigação e desenvolvimento) adequadas</li> <li>◆ Infra-estruturas físicas com bom funcionamento (estradas, comunicações, etc.) (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> </ul> <p><b>Ao Nível da Biotecnologia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Recursos humanos e <i>know-how</i></li> <li>◆ Contactos das empresas com o meio científico</li> <li>◆ Imagem de credibilidade das empresas</li> <li>◆ Estabelecimento de parcerias estratégicas com competidores nacionais e internacionais (<b>Centro de Inteligência em Inovação, 2005</b>)</li> </ul>	<p>W</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Normas culturais e sociais (aversão ao risco e dificuldades em lidar com o fracasso) (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005 e Andrez, 2006</b>)</li> <li>◆ Fraca capacidade financeira dos potenciais empreendedores e dificuldades de acesso a recursos financeiros / Falta de capital de risco nas empresas em fase de arranque (<b>Centro de Inteligência em Inovação, 2005 e Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> <li>◆ Localização da empresa e mercado onde actuam / Produtividade média baixa (<b>Centro de Inteligência em Inovação, 2005</b>)</li> <li>◆ Fraca oferta de serviços e produtos inovadores (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> </ul>
Externa (Ambiente)	<p>O</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Apoio do governo: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Conjuntura de incentivo</li> <li>○ Programas de apoio</li> </ul> </li> </ul> <p><b>Ao Nível da Biotecnologia:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Transferência de resultados de investigação e desenvolvimento (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> <li>◆ Existência de “<i>Clusters</i>” intensivos / Aumento do número de Parques de Ciência e Tecnologia e incubadoras de empresa (<b>Alípio, 2006 e Cunha et al., 2006</b>)</li> <li>◆ Mercado português é novo e emergente (<b>Centro de Inteligência em Inovação, 2005</b>)</li> <li>◆ Mercado aberto com fracas barreiras de entrada (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> </ul>	<p>T</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Burocracia e morosidade do aparelho burocrático (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> <li>◆ Instabilidade política (<b>Cunha et al., 2006</b>)</li> <li>◆ O sistema educacional português não prepara os estudantes para tirarem partido de novas oportunidades de negócio; não promove a criatividade nem o espírito inovador (<b>Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005</b>)</li> <li>◆ Concorrência entre “velhos negócios” e “novos negócios”</li> </ul>

### **Strengths (Energias):**

Ao nível interno, os principais pontos fortes são a existência de estruturas de Investigação e Desenvolvimento (I&D) adequadas e de infra-estruturas físicas com um bom funcionamento (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005).

Relativamente às empresas de biotecnologia, um estudo realizado em 2005, no âmbito do projecto Five (Fomento da Inovação e da Valorização Empresarial), refere que os principais pontos fortes destas empresas são os recursos humanos e o *know-how*, o que indica que em Portugal existe pessoal qualificado e com elevada capacidade de trabalho ao nível da biotecnologia. Os contactos que algumas destas empresas detêm com o meio científico, sobretudo as que se encontram em fase de arranque, são considerados vantagens para a sua progressão, colocando-as um passo em frente em relação aos seus competidores. Este estudo refere ainda que, para algumas das empresas de biotecnologia, a imagem de credibilidade que já adquiriram, mesmo as que não estão há muito tempo em actividade, é igualmente um ponto forte. Um outro ponto forte referido no estudo é que algumas destas empresas, sobretudo as que estão ligadas a áreas de prestação de serviços, estabelecem parcerias estratégicas com os competidores nacionais e internacionais, de forma a diminuir os efeitos da concorrência (Centro de Inteligência em Inovação, 2005).

### **Weaknesses (Debilidades):**

Os principais obstáculos ao empreendedorismo em Portugal são as normas culturais e sociais, nomeadamente a relutância ao risco e a dificuldade de lidar com o fracasso, contrariamente ao que acontece nos Estados Unidos, onde se encara o fracasso e os erros como experiências para o sucesso de tentativas posteriores. Este fenómeno alastra-se, embora com menor intensidade, ao espaço europeu em que estamos inseridos que se caracteriza como menos empreendedor do que o espaço americano. Por exemplo, quase metade dos europeus assume que não deve abrir uma empresa se houver riscos de o negócio falhar. Essa percentagem reduz-se para 25% nos Estados Unidos. (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005 e Andrez, 2006).

A fraca capacidade financeira dos potenciais empreendedores e sobretudo as dificuldades de acesso a mecanismos de suporte financeiros, quer da parte do estado, quer relativos ao capital privado são em geral um ponto fraco. Por vezes, isto é agravado pela falta de divulgação de informação sobre as diferentes fontes de financiamento disponíveis, factor que parece estar a ser reduzido devido ao aparecimento de inúmeros programas de

incentivo ao empreendedorismo (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005). Ao nível das empresas de biotecnologia, considera-se também os recursos financeiros como uma das principais debilidades. A falta de apoios financeiros como por exemplo a inexistência de capital de risco para a fase de arranque das empresas dificulta o início da actividade das mesmas (Centro de Inteligência em Inovação, 2005).

Para as empresas em desenvolvimento ou consolidadas, a localização da empresa e o mercado onde actuam são considerados pontos fracos. Por exemplo, para as empresas cuja marca ganhou alguma notoriedade no mercado, a dimensão relativamente pequena do mercado português é vista como uma fraqueza. Por outro lado, a nossa produtividade média é ainda baixa comparativamente com os indicadores dos outros países da Europa comunitária, isto é, precisamos de mais trabalho para produzir a mesma riqueza, tornando-nos menos competitivos no plano internacional (Centro de Inteligência em Inovação, 2005).

Apesar da existência de I&D adequada em Portugal, as ligações entre as várias organizações que proporcionam a I&D, como os centros de pesquisa e as universidades, com as entidades que procuram comercializar os resultados de I&D são ainda frágeis e susceptíveis de melhorias (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005). A fragilidade que ainda existe na transferência de tecnologia traduz-se por vezes numa fraqueza ao nível da oferta de serviços e produtos inovadores. No entanto, a transferência de tecnologia é considerada uma oportunidade, do ponto de vista do empreendedor.

### **Opportunities (Oportunidades):**

Actualmente existe um elevado grau de consciencialização por parte do governo português sobre a importância do empreendedorismo. Existe mesmo uma conjuntura de incentivo com diversos agentes, públicos e privados, que directa ou indirectamente actuam no apoio ao empreendedorismo ou criação de empresas em Portugal, oferecendo serviços em múltiplas vertentes de suporte ao início da actividade empresarial: administrativa, financeira, informativa, de aconselhamento técnico e apoio logístico, entre outras. Alguns exemplos das estruturas de apoio ao empreendedorismo em Portugal podem ser observados na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5 – Estruturas de apoio ao empreendedorismo em Portugal e até 2007.**

<b>Estruturas de apoio ao Empreendedorismo</b>	<b>Missão</b>
<b>Centros de Incubação de Negócios</b> (Exemplo: Centros empresariais ANJE - Associação Nacional de Jovens Empresários)	Acolhem projectos empresariais em fase inicial, disponibilizando espaços de incubação e prestando apoio técnico qualificado para o arranque do negócio.
<b>Centros de Inovação e Transferência de Tecnologia</b> (Exemplos: Centros tecnológicos e Parques Tecnológicos)	Funcionam como ligação dos centros do conhecimento à empresa, apoiando a inovação e o desenvolvimento tecnológico aplicado ao mundo dos negócios.
<b>Centros de Formalidades das Empresas</b>	Facilitam e simplificam processos administrativos, permitindo a realização dos procedimentos legais de constituição de sociedades num único local, com atendimento personalizado e prazos reduzidos.
<b>Agentes Financeiros</b> (Exemplos: Banca, Sociedades de Capital de risco; Sociedades de garantia mútua)	Suportam financeiramente os projectos empresariais, tanto nas fases de arranque como de consolidação dos negócios, através de soluções variadas de crédito ou de reforço de capitais próprios (capital de risco).
<b>Outras Instituições de Apoio ao Empreendedorismo (endereços electrónicos)</b>	
<b>ADI</b> – Agência de Inovação ( <a href="http://www.adi.pt/">http://www.adi.pt/</a> ) <b>AEP</b> – Associação Empresarial de Portugal ( <a href="http://www.aeportugal.pt/">http://www.aeportugal.pt/</a> ) <b>ANJE</b> – Associação Nacional de Jovens Empresários ( <a href="http://www.anje.pt/">http://www.anje.pt/</a> ) <b>CEDINTEC</b> – Centro para o Desenvolvimento e Inovação Tecnológicos ( <a href="http://www.cedintec.pt/">http://www.cedintec.pt/</a> ) <b>COTEC</b> – Associação Empresarial para a Inovação ( <a href="http://www.cotecportugal.pt/">http://www.cotecportugal.pt/</a> ) <b>CPIN</b> – Centro Promotor de Inovação e Negócios ( <a href="http://www.cpin.pt/">http://www.cpin.pt/</a> ) <b>FCT</b> – Fundação para a Ciência e a Tecnologia ( <a href="http://alfa.fct.mctes.pt/">http://alfa.fct.mctes.pt/</a> ) <b>IAPMEI</b> – Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e ao Investimento ( <a href="http://www.iapmei.pt/">http://www.iapmei.pt/</a> ) <b>IDIT</b> – Instituto de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica ( <a href="http://www.idit.up.pt/">http://www.idit.up.pt/</a> ) <b>IEFP</b> – Instituto do Emprego e Formação Profissional ( <a href="http://www.iefp.pt/">http://www.iefp.pt/</a> ) <b>IFDEP</b> – Instituto para o Fomento e Desenvolvimento do Empreendedorismo em Portugal ( <a href="http://www.ifdep.pt/">http://www.ifdep.pt/</a> ) <b>MEI</b> – Ministério da Economia e da Inovação ( <a href="http://www.min-economia.pt/">http://www.min-economia.pt/</a> )	

A par destas instituições de incentivo ao empreendedorismo, existem também várias outras a nível regional. Além disso, verificou-se um aumento da oferta nacional em Mestrados e Pós-graduações em empreendedorismo e gestão da inovação. Alguns exemplos são: mestrado em Economia da Inovação e Empreendedorismo da Faculdade de Economia da Universidade do Algarve (Centro Regional para a Inovação do Algarve (actualizado em 2007)); o mestrado em Inovação e Empreendedorismo Tecnológico da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (Mestrado em Inovação e Empreendedorismo Tecnológico (actualizado em 2008)); a pós-graduação em Gestão e Empreendedorismo Cultural e Criativo do Instituto para o Desenvolvimento da Gestão

Empresarial (Instituto para o Desenvolvimento da Gestão Empresarial (actualizado em 2008)).

Nestes últimos anos foram também criados por diversas instituições inúmeros programas de apoio ao empreendedorismo em Portugal. Entre eles encontram-se o Programa PRIME – Programa de Incentivos à Modernização da Economia, do MEI (Gabinete de Gestão do PRIME (actualizado em 2008)); o Programa NEOTEC – Novas Empresas Tecnológicas, da ADI (UMIC - Agência para a Sociedade do Conhecimento, IP (actualizado em 2008)); o Programa FINICIA – Financiamento no arranque de empresas, da IAPMEI (Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação (actualizado em 2008a)); e o Programa Fin cresce – Financiamento de estratégias de crescimento das empresas, da IAPMEI (Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação (actualizado em 2008b)).

O aumento do número de programas de apoio ao empreendedorismo surge acompanhado pela proliferação de concursos de ideias nas várias áreas em desenvolvimento, como a Empreenda'07, feira de ideias e financiamento do IAPMEI, e a BioEmpreenda'08, também do IAPMEI, especialmente direccionada para novos projectos na área das biotecnologias.

A transferência de resultados de I&D (transferência de tecnologia) é o processo pelo qual uma tecnologia existente é aplicada a uma nova utilização ou a um novo utilizador. Esta definição tem subjacente o facto da transferência de tecnologia assentar quase exclusivamente na base tecnológica já existente, promovendo o aumento da intensidade da sua utilização, mais do que a expansão da base através de um esforço de I&D (Peters, 2000). Esta transferência pode ocorrer entre qualquer entidade que detenha o conhecimento científico e tecnológico específico e qualquer outra entidade que tenha o interesse em obter o direito a utilizá-lo. Quando uma nova tecnologia emerge do processo de geração do conhecimento, muitos passos têm que ser dados até se tornar comerciável, sendo necessário desenvolver a tecnologia, criar protótipos, testar a sua aplicação em grande escala, etc (Unidade de Coordenação do Plano Tecnológico, 2005). As universidades, onde ocorre grande parte da investigação e desenvolvimento de novas ideias, podem desempenhar um papel fundamental no estabelecimento de pontes entre a inovação tecnológica e o mercado, sendo cruciais neste processo de transferência de tecnologia (Etzkowitz, 2001).



Uma outra oportunidade, sobretudo para a grande maioria das empresas de biotecnologia, é o mercado onde actuam, dado que se trata de um mercado novo e emergente, quer em Portugal e na Europa, quer no resto do Mundo (Centro de Inteligência em Inovação, 2005).

Para além disso o mercado Português no seu colectivo é considerado aberto às empresas novas e em crescimento, constatando-se que as empresas em Portugal conseguem entrar no mercado sem serem injustamente bloqueadas pelas empresas já implementadas. Por outro lado, as leis *anti-trust*, que limitam o poder dos monopólios, são eficientes na protecção dos direitos de propriedade intelectual (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005).

A existência de *clusters* intensivos em Portugal também pode funcionar como uma oportunidade para fomentar o empreendedorismo. Michael Porter, no início dos anos 90, começou a designar por *clusters* as aglomerações territoriais de competências em determinadas áreas industriais e de conhecimento (Porter, 1998). Estes espaços de aglomeração local constituem uma zona fundamental para o surgimento e alimento de empreendedores e de criação de novas empresas. “As pessoas que trabalham nestes ambientes conseguem com maior facilidade aperceber-se das falhas de mercado a partir das quais poderão lançar os seus negócios. Além disso, em tais aglomerações as barreiras à entrada são em geral mais baixas do que noutros locais isolados.” (Porter, 1998). Dada a importância das universidades como fontes de recursos humanos competentes na área da biotecnologia, constata-se também a implantação de novas infra-estruturas tecnológicas e empresas ligadas à biotecnologia na sua proximidade e a elas associadas, tais como o IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular (Instituto de Biologia Molecular e Celular (actualizado em 2007)) e o IPATIMUP – Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (actualizado em 2007)) da Universidade do Porto, ou o CESAM – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, da Universidade de Aveiro (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (actualizado em 2008)). Deste último laboratório associado nasceu recentemente o projecto empresarial *FishCare* – sistema integrado de monitorização e tratamento de água de aquaculturas, uma das spin-off constituídas na Universidade de Aveiro.

Ainda como factor positivo verificou-se a partir, do final dos anos 80, início dos anos 90, um aumento do número de Parques de Ciência e Tecnologia e incubadoras de empresas, o que contribuiu para fomentar a qualidade das infra-estruturas e o aumento da

probabilidade das empresas novas serem bem sucedidas (Alípio, 2006 e Cunha *et al.*, 2006). Apesar de inicialmente ter existido uma grande concentração destas infra-estruturas nas duas maiores áreas populacionais (grande Lisboa e grande Porto), o aparecimento de novos pólos de conhecimento muito dinâmicos, localizados fora destas duas áreas, conduziu ao aparecimento de infra-estruturas tecnológicas em torno do eixo Aveiro-Braga e do distrito de Coimbra. No entanto, continuam a verificar-se algumas assimetrias regionais com uma concentração destas infra-estruturas no litoral do país e, em particular, em torno das cidades de Lisboa e Porto (Cunha *et al.*, 2006).

Na Tabela 1.6, encontram-se os Parques Tecnológicos associados à biotecnologia, em actividade no ano de 2006 em Portugal.

**Tabela 1.6 – Parques tecnológicos associados à biotecnologia no ano de 2006 em Portugal, organizados por localização e por ano de criação, adaptado de Alípio, 2006 e Cunha *et al.*, 2006.**

Localização		Parques Tecnológicos (endereços electrónicos)	Ano de Criação
Grande Lisboa		Lispólis – Pólo Tecnológico de Lisboa ( <a href="http://www.lispolis.pt">http://www.lispolis.pt</a> )	1985
		Taguspark ( <a href="http://www.taguspark.pt">http://www.taguspark.pt</a> )	1992
		PTM/A – Parque Tecnológico de Mutela/Almada ( <a href="http://www.caixadimagens.pt/ptma">http://www.caixadimagens.pt/ptma</a> )	1994
		Madam Park – Parque de Ciência e Tecnologia Almada/Setúbal ( <a href="http://www.madanparque.pt/">http://www.madanparque.pt/</a> )	1995
Grande Porto		Tecmaia – Parque de Ciência e Tecnologia da Maia ( <a href="http://www.tecmaia.pt/site">http://www.tecmaia.pt/site</a> )	1999
		UPTEC - Incubadora de Base Tecnológica da Universidade do Porto ( <a href="http://www.uptec.up.pt">http://www.uptec.up.pt</a> )	2007
Resto do país	Madeira	Madeira Tecnopólo ( <a href="http://www.madeiratecnopolo.pt">http://www.madeiratecnopolo.pt</a> )	1997
	Coimbra	Tecnopólo de Coimbra	(em projecto desde 1998)
	Covilhã	Parkurbis ( <a href="http://www.parkurbis.pt/">http://www.parkurbis.pt/</a> )	2001
	Cantanhede	Biocant Park – Parque Tecnológico de Cantanhede ( <a href="http://www.biocant.pt">http://www.biocant.pt</a> )	2003
	Braga (Taipas)	Avepark ( <a href="http://www.avepark.pt">http://www.avepark.pt</a> )	2004
	Abrantes	Tecnopolo do Vale do Tejo (Tagus Valley) ( <a href="http://www.tagusvalley.pt">http://www.tagusvalley.pt</a> )	2004
	Algarve	Tecnopólo do Algarve (Algarve STP - Parque de Ciência e Tecnologia do Algarve)	Fase de arranque

### **Threats (Ameaças):**

Apesar de, no geral, as políticas em Portugal serem benéficas para os empreendedores, existem algumas ameaças ao empreendedorismo. As burocracias são muito morosas e resultam de interações ineficientes entre as entidades governamentais e os empreendedores, pelo que as políticas, mesmo sendo positivas, não exercem o impacto que seria esperado no empreendedorismo (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005). A motivação individual para a actividade empresarial depende de uma série de factores práticos – a redução do tempo para a criação de uma empresa, a desburocratização de processos, a facilidade de recrutamento de pessoal qualificado e o acesso ao financiamento são alguns dos exemplos de facilitação institucional que podem fazer a diferença. Desta forma, o programa Empresa na Hora da IAPMEI pode constituir um facilitador desta desburocratização de processos (Empresa na hora (actualizado em 2006)).

Uma outra ameaça são as frequentes alterações das políticas e do leque de medidas existentes, causando instabilidade, à qual os investidores são avessos (Cunha *et al.*, 2006). A estabilidade política favorece o investimento da iniciativa privada e, por conseguinte, o desenvolvimento dos negócios e o aumento de criação de riqueza, já que promove a passagem de sinais claros sobre orientações das políticas públicas, o que permite aos investidores orientarem a sua acção para actividades onde o Estado concentra mecanismos de facilitação institucional ou apoios e subsídios.

De acordo com o estudo de avaliação do potencial empreendedor em Portugal, realizado em 2004, o sistema educacional foi considerado inadequado para o fomento do empreendedorismo, não preparando os alunos para aproveitarem as oportunidades de negócio da melhor forma e não havendo uma ligação entre o mundo dos negócios e a escola, sobretudo ao nível do ensino básico e secundário (Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005). Apesar disso, notam-se alguns progressos ao nível do ensino superior, incluindo, a realização mais frequente de estudos sobre empreendedorismo (Godinho *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2007).

Por fim, ainda dentro das ameaças ao empreendedorismo existe a concorrência, nomeadamente a que se estabelece entre os “novos negócios” e os “velhos negócios”. Por vezes pode haver uma resistência a novos produtos e tecnologias, devido à incerteza que causam, uma vez que estes entram em competição com outros produtos e tecnologias que já são bem conhecidos dos clientes. É o que pode acontecer na Microbiologia, no caso das técnicas moleculares de identificação de microrganismos que, por serem mais recentes e

ainda estarem a ser optimizadas, podem ser alvo de resistência por parte de clientes já habituados a técnicas clássicas de identificação de microrganismos, amplamente utilizadas.

Na presente tese far-se-á a discussão sobre algumas das técnicas moleculares de detecção e identificação de um grupo de microrganismos - as bactérias redutoras do sulfato - e do potencial de utilização destes métodos moleculares em novos negócios. A escolha do grupo de microrganismos prende-se com a sua importância ambiental e económica, uma vez que estas bactérias interferem em processos industriais, como a biorremediação de efluentes e a biocorrosão de equipamentos industriais.

## 2 Objectivos

A presente tese tem como objectivo principal:

- Encontrar oportunidades de negócio nos serviços oferecidos pela abordagem molecular de detecção de microrganismos na resolução de problemas industriais relacionados com as bactérias redutoras do sulfato (SRB).

Como forma de atingir este objectivo, foram deliniados os seguintes objectivos específicos:

1. Entender a dimensão dos problemas industriais relacionados com as SRB e compreender o interesse ambiental e económico deste grupo de microrganismos;
2. Analisar as vantagens e desvantagens de diferentes técnicas da abordagem molecular de detecção de microrganismos, direccionada para um grupo de microrganismos com interesse ambiental e económico – as SRB;
3. Avaliar o potencial de aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de SRB em diversos ambientes;
4. Sugerir a implementação de serviços de laboratório com recurso a estratégias moleculares na resolução de problemas industriais relacionados com as SRB, procurando assim oportunidades de negócio para os laboratórios de microbiologia.

## 3 Bactérias Redutoras de Sulfato (SRB)

### 3.1 Ecologia e filogenia das SRB

As bactérias redutoras de sulfato (SRB) constituem um grupo morfológica e filogeneticamente heterogêneo que inclui bactérias e arqueobactérias. São bactérias anaeróbias, maioritariamente gram negativas, mesofílicas e algumas termofílicas, geralmente não formadoras de esporos e desempenham um papel importante no ciclo do enxofre, utilizando o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) como aceitador final de electrões na degradação da matéria orgânica (Castro *et al.*, 2000). Na Figura 3.1 pode observar-se o ciclo do enxofre, no qual as bactérias redutoras do sulfato participam.

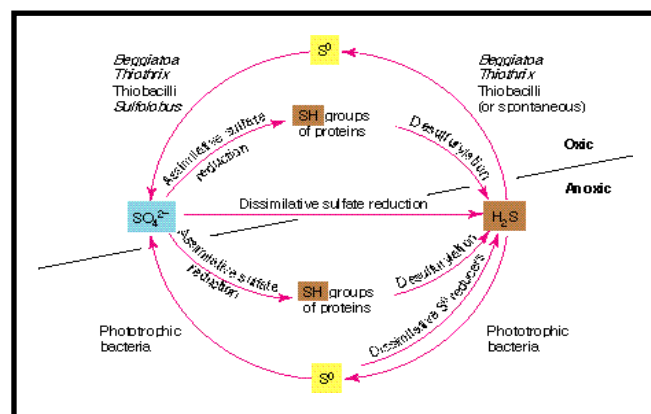


Figura 3.1 – Ciclo do enxofre (Madigan *et al.*, 1997).

As SRB são capazes de reduzir o sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) e por vezes outros compostos de enxofre, como o sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) e o tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), a sulfureto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), isto é, realizam a redução desassimilativa do ião sulfato, uma vez que a maior parte do enxofre reduzido não é incorporado, sendo que este ião actua como agente oxidante para metabolizar a matéria orgânica (Madigan *et al.*, 1997a). A redução do sulfato é facilmente reconhecível na natureza graças ao odor a “ovo podre” resultante da produção de sulfureto de hidrogénio.

Estas bactérias crescem heterotroficamente podendo utilizar vários substratos orgânicos como fontes de carbono e dadores de electrões, como o lactato, o piruvato, o acetato, o etanol ou determinados ácidos gordos. Podem ainda crescer autotroficamente usando o

hidrogénio como fonte de electrões e o dióxido de carbono como fonte de carbono (Madigan *et al.*, 1997b).

As SRB apresentam grande ubiquidade. Em ambientes com grande concentração de sulfato, a redução de sulfato domina a degradação da matéria orgânica. Por exemplo em ambientes marinhos, a redução de sulfato ultrapassa até 50% a degradação total da matéria orgânica (Jørgensen, 1982). Para além de estarem presentes nos ambientes marinhos, as SRB foram também encontradas noutros ambientes, tais como, sedimentos de lagos de água doce, apesar de normalmente limitados em sulfato (Sass *et al.*, 1996 e Li *et al.*, 1998). Também têm sido detectadas em ambientes industriais, como aqueles relacionados com petróleo (Jan-Roblero *et al.*, 2004), tratamentos de águas (Ito *et al.*, 2002; Içgen *et al.*, 2006; e Ben-Dov *et al.*, 2007), em sistemas de aquecimento (Kjellerup *et al.*, 2005) e arrefecimento de água de reactores nucleares (Rao *et al.*, 2000). Adicionalmente também estão presentes na boca e no intestino de animais (Loubinoux *et al.*, 2003). Dada a sua natureza anaeróbica, normalmente as SRB estão associados a biofilmes anaeróbios (Davey *et al.*, 2000 e Beech, 2003), no entanto foram também detectadas em ambientes aeróbios, tais como em zonas oxigenadas em comunidades de cianobactérias (Dar *et al.*, 2005) e em biofilmes que crescem em condições oxigenadas, nas condutas de tratamento de água (Ito *et al.*, 2002). Esta "tolerância" ao oxigénio é possível devido a uma variedade de mecanismos, que embora inicialmente descritos apenas para as SRB, mais tarde se provaram existir na maioria dos organismos anaeróbios. Foi verificado que as SRB terão todas as enzimas necessárias para viver em condições de aerobiose, isto é, em determinadas condições de crescimento, estas bactérias expressam todos os componentes necessários para a formação de uma cadeia respiratória membranar, capaz de reduzir completamente o oxigénio a água (Madigan *et al.*, 1997c).

Utilizando a análise de sequências de genes do rRNA foi possível estabelecer a classificação filogenética das SRB, permitindo organizar as várias espécies de SRB em quatro grupos distintos: bactérias redutoras do sulfato mesofílicas gram-negativas, bactérias redutoras do sulfato gram-positivas formadoras de esporos, bactérias redutoras do sulfato termofílicas e arqueobactérias redutoras do sulfato termofílicas (Castro *et al.*, 2000). Na Tabela 3.1 estão referidos os géneros característicos destes grupos filogenéticos, bem como algumas características e ambientes onde estão presentes.

**Tabela 3.1 – Grupos filogenéticos e algumas características de SRB, adaptado e atualizado de Castro, 2000.**

	Temperatura de crescimento (°C)	Gêneros	Características	Ambientes Naturais	Ambientes Industriais	Referências
Grupos filogenéticos de SRB	Gram-negativas mesofílicas	20 – 33	<i>Desulfobacter</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Células – ovais, bastonetes</li><li>• 44-46% de conteúdo em GC</li><li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li><li>• Sem citocromos</li><li>• Dadores de electrões – hidrogénio. Oxidação completa do acetato.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ambientes marinhos (meios com elevados níveis de cloreto de sódio e de magnésio).</li><li>• Tracto gastro-intestinal de animais e seres humanos.</li><li>• Cavidade oral, bolsas periodontais.</li><li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, ph 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Igen <i>et al.</i>, 2006</li><li>• Genevau, 2001</li><li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li></ul>
		20 – 35	<i>Desulfobacterium</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Células – ovais, bastonetes</li><li>• 41-52% de conteúdo em GC</li><li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li><li>• Citocromos b e c</li><li>• Dadores de electrões – diversos substratos tais como ácidos gordos de cadeia curta, hidrogénio, álcoois e compostos aromáticos. Oxidação completa do acetato.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ambientes marinhos (meios com elevada concentração de cloreto de sódio).</li><li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, ph 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Igen <i>et al.</i>, 2006</li><li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li></ul>
		25 – 40	<i>Desulfobulbus</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Células – bastonetes</li><li>• 59-60% de conteúdo em GC</li><li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li><li>• Citocromos b, c, c<sub>3</sub></li><li>• Dadores de electrões – propionato, lactato, etanol e hidrogénio. Oxidação incompleta do acetato.</li><li>• Tolerância ao oxigénio, podendo utilizar o nitrato ou o oxigénio, em vez do sulfato como aceitador final de electrões.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sedimentos de pântanos salgados; Estuários e lagos de água doce.</li><li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li><li>• Zonas aeróbias de comunidades microbianas.</li><li>• Tracto gastro-intestinal de animais e seres humanos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, ph 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li><li>• Biofilmes de esgotos crescidos em condições aeróbicas, lamas activadas.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Igen <i>et al.</i>, 2006</li><li>• Ito <i>et al.</i>, 2002</li><li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li><li>• Genevau, 2001</li></ul>
		25 – 40	<i>Desulfomicrobium</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Células – ovais, bastonetes</li><li>• 52-67% de conteúdo em GC</li><li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li><li>• Citocromos b e c</li><li>• Dadores de electrões – lactato, piruvato, hidrogénio, etanol e formato. Oxidação incompleta do acetato.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cavidade oral, bolsas periodontais.</li><li>• Sedimentos de estuário, lagos salgados e de água doce.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Esgotos industriais com elevada salinidade, sendo responsáveis por odores desagradáveis e pela corrosão dos sistemas de tratamento de esgotos.</li><li>• Biofilmes de esgotos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Genevau, 2001</li><li>• Ben-Dov <i>et al.</i>, 2007</li><li>• Ito <i>et al.</i>, 2002</li></ul>
		30 – 40	<i>Desulfomonas</i> <ul style="list-style-type: none"><li>• Células – bastonetes</li><li>• Imóveis</li><li>• 66% de conteúdo em GC</li><li>• Com <i>desulfovirlin</i></li><li>• Citocromo c</li><li>• Dadores de electrões – lactato, piruvato, hidrogénio, etanol. Oxidação incompleta do acetato.</li><li>• Recentemente a única espécie <i>Desulfomonas pigra</i> foi reclassificada como <i>Desulfovibrio pigra</i>.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tracto gastro-intestinal e fezes de animais e seres humanos.</li></ul>		<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Loubinoux <i>et al.</i>, 2002</li><li>• Genevau, 2001</li><li>• Loubinoux <i>et al.</i>, 2003</li><li>• Ben-Dov <i>et al.</i>, 2007</li><li>• Ito <i>et al.</i>, 2002</li></ul>



Grupos filogenéticos de SRB							
Gram-negativas mesofílicas	25 – 40	<i>Desulfovibrio</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Células – espirais, vibriões</li><li>• Móveis (algumas imóveis)</li><li>• 49-66% de conteúdo em GC</li><li>• Com ou sem <i>desulfovibrin</i></li><li>• Citocromos c<sub>3</sub>, b e c</li><li>• Dadores de electrões – compostos orgânicos simples (lactato e piruvato), hidrogénio e etanol. Oxidação incompleta do acetato.</li><li>• Tolerância ao oxigénio, podendo utilizar o nitrato ou o oxigénio, em vez do sulfato como aceitador final de electrões.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Ambientes aquáticos (doces e salinos) com elevada concentração de matéria orgânica, solos.</li><li>• Sedimentos marinhos, de água doce e de estuários.</li><li>• Fezes e intestino de animais e seres humanos.</li><li>• Cavidade oral, bolsas periodontais.</li><li>• Amostras de pús toracico-abdominal removidos após cirurgias, em abscessos abdominais e cerebrais, no sangue e urina de seres humanos infectados.</li><li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Tubagens de gás e petróleo, poços e locais de furos petrolíferos sistemas de transporte e armazenamento de gás e petróleo.</li><li>• Permutadores de calor, cascos de navio, estando associadas à biocorrosão destes materiais.</li><li>• Esgotos industriais com elevada salinidade, sendo responsáveis por odores desagradáveis e pela corrosão dos sistemas de tratamento de esgotos.</li><li>• Sistema de refrigeração de água de reactor nuclear, causando corrosão das tubagens e problemas nas válvulas e filtros.</li><li>• Biofilmes de esgotos crescidos em condições aeróbicas, lamas activadas, zonas aeróbias de comunidades microbianas. Aços inoxidáveis, provocando corrosão microbiológica.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Içgen <i>et al.</i>, 2006</li><li>• Ito <i>et al.</i>, 2002</li><li>• Heidelberg <i>et al.</i>, 2004</li><li>• Genevoux, 2001</li><li>• Loubinoux <i>et al.</i>, 2003</li><li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li><li>• Zhu <i>et al.</i>, 2003</li><li>• Jan-Roblero <i>et al.</i>, 2004</li><li>• National Center for Biotechnology Information (actualizado em 2008)</li><li>• Rajasekar <i>et al.</i>, 2007</li><li>• Beech <i>et al.</i>, 1994</li><li>• Ben-Dov <i>et al.</i>, 2007</li><li>• Rao <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Pimenta <i>et al.</i>, 2003</li></ul>	
	28 – 35	<i>Desulfococcus</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Células – cocos, ovais</li><li>• 46-57% de conteúdo em GC</li><li>• Com ou sem <i>desulfovibrin</i> Citocromos b e c</li><li>• Dadores de electrões – hidrogénio. Oxidação completa do acetato.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, ph 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Içgen <i>et al.</i>, 2006</li><li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li></ul>	
	37	<i>Desulfomonile</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Células – bastonetes</li><li>• Imóveis</li><li>• 49% de conteúdo em GC</li><li>• Com <i>desulfovibrin</i></li><li>• Citocromo c<sub>3</sub></li><li>• Dadores de electrões – benzoato, lactato, formato, hidrogénio, butirato, propionato, e piruvato. Oxidação completa do acetato.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sedimentos marinhos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Lamas de esgotos.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Sun <i>et al.</i>, 2001</li><li>• Pimenta <i>et al.</i>, 2003</li></ul>	
	28 – 32	<i>Desulfonema</i>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Células – filamentos</li><li>• Mobilidade – deslizamento, permitindo mover-se para ambientes favoráveis</li><li>• Resistência à fagocitose por amibas e ciliados</li><li>• 35-42% de conteúdo em GC</li><li>• Com ou sem <i>desulfovibrin</i></li><li>• Citocromos b e c</li><li>• Dadores de electrões – Oxidação completa do acetato.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Comunidades microbianas marinhas e de água doce.</li><li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, ph 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li><li>• Içgen <i>et al.</i>, 2006</li><li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li></ul>	

Grupos filogenéticos de SRB	Gram-negativas mesofílicas	33	<i>Desulfosarcina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células – bastonetes ovais ou cocos, formando grupos</li> <li>• Resistência a condições ambientais desfavoráveis tais como presença de oxigénio.</li> <li>• 51% de conteúdo em GC</li> <li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li> <li>• Citocromos b e c</li> <li>• Dadores de electrões – hidrogénio. Oxidação completa do acetato e de outros ácidos gordos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sedimentos marinhos e plancton de pântanos salgados.</li> <li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, pH 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li> <li>• Içgen <i>et al.</i>, 2006</li> <li>• Karr <i>et al.</i>, 2005</li> </ul>
	Gram-positivas formadoras de esporos	Maioria 25 – 40 Alguns 40 – 65	<i>Desulfotomaculum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células – bastonetes</li> <li>• Móveis</li> <li>• A formação de esporos permite a este grupo sobreviver a longos períodos de dessecação e condições aeróbias.</li> <li>• 48-52% conteúdo em GC</li> <li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li> <li>• Citocromos b e c</li> <li>• Dadores de electrões – succinato, etanol, indol, acetona entre outros. Oxidação completa/incompleta do acetato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arrozais (alternância de condições anaeróbias e aeróbias devido às inundações sazonais).</li> <li>• Tracto gastro-intestinal de animais e seres humanos.</li> <li>• Sedimentos e camadas inferiores de um lago congelado da antártida (ambiente anaeróbio e com salinidade crescente com a profundidade).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bioreactores anaeróbios usados para o tratamento de esgotos, operados a 35 °C, pH 7,8, contendo sulfato como aceitador terminal de electrões e acetato como fonte de carbono e dador de electrões.</li> <li>• Biofilmes dos sistemas de aquecimento, sendo responsáveis pelo <i>biofouling</i> e biocorrosão que reduzem o seu tempo de vida e aumentam os custos operacionais.</li> <li>• Aços inoxidáveis, provocando corrosão microbiológica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Castro <i>et al.</i>, 2000</li> <li>• Genevaux, 2001</li> <li>• Içgen <i>et al.</i>, 2006</li> <li>• Kjellerup <i>et al.</i>, 2005</li> <li>• Pimenta <i>et al.</i>, 2003</li> </ul>
	Bactérias termofílicas	65 – 70 (podendo sobreviver a temperaturas mais baixas)	<i>Thermodesulfobacterium</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células – bastonetes, vibriões</li> <li>• 30-38% conteúdo em GC</li> <li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li> <li>• Citocromos c<sub>3</sub> e c</li> <li>• Dadores de electrões – hidrogénio, lactato, piruvato e etanol. Oxidação incompleta de acetato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lagoas hidrotermais (ex. <i>Yellowstone National Park</i>) e regiões vulcânicas.</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Madigan <i>et al.</i>, 1997b</li> <li>• Castro <i>et al.</i>, 2000b</li> </ul>
	Arqueobactérias termofílicas	64 – 92	<i>Archaeoglobus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células – cocos irregulares com uma cápsula de glicoproteínas e flagelos monopolares.</li> <li>• 41-46% conteúdo em GC</li> <li>• Sem <i>desulfovirlin</i></li> <li>• Dadores de electrões – Oxidação de diversas fontes de carbono orgânicas incluindo polímeros complexos. Oxidação incompleta do acetato.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sistemas hidrotermais marinhos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reserva petrolífera de altas temperaturas, onde podem causar a acidificação do petróleo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Madigan <i>et al.</i>, 1997b</li> <li>• Castro <i>et al.</i>, 2000b</li> </ul>

Apesar desta divisão por Castro *et al.* (2000) das SRB em quatro grupos filogenéticos, outras divisões podem ser criadas à medida que aumentar a informação acerca da diversidade de SRB em ambientes extremos (Castro *et al.*, 2000). Foi registada a ocorrência de redução do sulfato em ambientes com temperaturas entre 100 e 110 °C, concluindo-se que podem existir SRB hipertermofílicas ainda a ser descobertas (Jørgensen *et al.*, 1992); foi também relatada a ocorrência de degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em condições onde ocorre a redução do sulfato (Coates *et al.*, 1996). Além disso, conhece-se a existência de vários grupos de SRB em lagos permanentemente congelados na Antártida (Karr *et al.*, 2005). Admite-se ainda que existem várias bactérias redutoras do sulfato não cultiváveis (Castro *et al.*, 2000).

### 3.2 Papel das SRB na microbiologia ambiental e industrial

As SRB têm grande relevância na microbiologia ambiental e industrial.

A nível ambiental, estiveram na origem do desenvolvimento da biosfera e desempenham um papel essencial no ciclo do enxofre. Para além disso, as SRB regulam vários processos ambientais, tais como a decomposição da matéria orgânica, a biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos clorados em ambientes anaeróbios e a metilação do mercúrio (Castro *et al.*, 2000).

Relativamente à indústria, as SRB estão presentes em comunidades complexas de microrganismos envolvidas nos processos de digestão anaeróbia utilizadas no tratamento de águas e esgotos municipais e industriais (Ben-Dov *et al.*, 2007).

As SRB são ainda utilizadas na biorremediação de efluentes ricos em metais pesados. Diversas indústrias, como as de processamento de metais, geram efluentes contendo metais pesados e outros poluentes inorgânicos como o sulfato. Estes efluentes são altamente prejudiciais para o ambiente e para o homem, dado que os metais se podem acumular ao longo das cadeias alimentares, além de interferirem no processo natural de auto-depuração. Sendo assim, devem ser tratados antes de serem lançados no ambiente (Higgins *et al.*, 2003). Dado que, os processos de remoção de metais pesados vulgarmente utilizados, como a precipitação química, a troca iónica ou a separação por membranas apresentam por vezes restrições de ordem técnica (não sendo eficazes para a diminuição do sulfato) ou económica pelo elevado custo, os processos biotecnológicos representam uma alternativa de tratamento com custos mais reduzidos e mais eficientes na remoção destes compostos (Carlos *et al.*, 2007). Um destes processos consiste na utilização de SRB que, em condições anaeróbias reduzem o sulfato, presente nos efluentes, a sulfureto de hidrogénio que reage com os metais precipitando-os em sulfuretos metálicos insolúveis. Este processo favorece a remoção dos metais pesados numa forma mais estável, juntamente com a diminuição do sulfato e dos compostos orgânicos dos efluentes, sendo um processo com baixo consumo energético (Higgins *et al.*, 2003 e Carlos *et al.*, 2007).

O principal inconveniente da redução de sulfato no tratamento de águas e esgotos é a produção de sulfureto de hidrogénio, que é tóxico e provoca odores desagradáveis além de potenciar a corrosão nas estações de tratamento de água (Ito *et al.*, 2002).

Por outro lado, as SRB têm também um grande impacto económico na indústria petrolífera, onde causam problemas graves, incluindo a acidificação do petróleo e do gás, a ocorrência de depósitos e a corrosão das instalações de produção (Muyzer *et al.*, 2008).

Mais recentemente, foram associadas a uma variedade de patologias humanas, como a periodontite, a colite ulcerosa, a bacteremia e doenças infecciosas crónicas actuando directamente em infecções ou tendo o papel de oportunistas (Genevaux, 2001, Goldstein *et al.*, 2003 e Loubinoux *et al.*, 2003).

Porém, é sobretudo a sua relação com os fenómenos de biocorrosão que justificam a importância económica que este grupo de bactérias tem.

### 3.3 SRB e biocorrosão

Vários microrganismos, nomeadamente, bactérias, fungos e algas, estão envolvidos no processo de deterioração de superfícies. Entre os microrganismos relacionados com a biocorrosão, as SRB são apontadas como o grupo responsável pelos casos mais graves, sendo os principais culpados pela biocorrosão de materiais de ferro e aço usados na indústria.

#### 3.3.1 Corrosão

A corrosão pode ser definida como sendo a deterioração de um material, geralmente metálico, por acção química ou electroquímica do meio ambiente aliada ou não a esforços mecânicos. A deterioração representa alterações prejudiciais e indesejáveis sofridas pelo material, tais como desgaste, variações químicas e estruturais (Peres, 2006).

Este fenómeno consiste no retrocesso natural dos metais processados, como o ferro, o cobre e o zinco, ao seu estado nativo como compostos químicos ou minerais. Por exemplo, o ferro no seu estado natural é um composto oxidado (exemplos:  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{FeO}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), mas quando processado metalurgicamente em aço, perde o oxigénio e torna-se em ferro elementar (Fe). Na presença de água ou oxigénio, o Fe oxida, revertendo-se em óxidos de ferro.

Trata-se de um processo electroquímico no qual se estabelece uma diferença de potencial eléctrico entre dois metais ou entre dois pontos dum mesmo metal, e que envolve fundamentalmente duas reacções: 1) A perda de material do ânodo, em que o Fe é libertado para a solução aquosa e oxida-se em  $\text{Fe}^{2+}$ , ocorrendo a libertação de dois electrões (reacção anódica); 2) O oxigénio ( $\text{O}_2$ ) na solução aquosa move-se para o cátodo completando o circuito eléctrico utilizando os electrões para formar hidroxilos ( $\text{OH}^-$ ) na superfície do metal (reacção catódica). Em ambientes anaeróbios o  $\text{O}_2$  é substituído por iões de hidrogénio ou pela água como agentes da reacção catódica (Videla e Wilkes, 1997 e Peres, 2006).

Existem alguns factores que promovem a corrosão (Mascia, 2003, Ayazi *et al.*, 2006 e Magalhães, 2007) como:

- valores baixos de pH, isto é, ambientes acídicos, uma vez que quanto menor for o pH da água, maior será a concentração de iões de hidrogénio, que aceleram a corrosão;

- o aumento de temperatura do meio, que faz aumentar a velocidade das reacções envolvidas na corrosão;
- a presença de determinados sais dissolvidos (sais de cloreto e sulfatos) que aumentam a condutividade eléctrica;
- a presença de alguns gases dissolvidos (dióxido de carbono; oxigénio, amónia...);
- a existência de áreas metálicas relativas, isto é, presença de metais diferentes em contacto entre si, que promove o aparecimento de zonas de diferença de potencial eléctrico originando células de corrosão;
- a presença de matéria em suspensão, que provoca depósitos porosos que facilitam o aparecimento de células de corrosão por arejamento diferencial.
- a presença de microrganismos, que promovem a corrosão ao libertarem hidrogénio no decorrer do seu metabolismo; as bactérias anaeróbicas formam células de corrosão por arejamento diferencial e algumas espécies produzem compostos ácidos.

A corrosão induzida ou acelerada por microrganismos é denominada de biocorrosão, apresentando a mesma natureza eletroquímica da corrosão tradicional (Videla *et al.*, 2005).

### **2.3.2 Biocorrosão**

Os microrganismos em ambiente natural tendem a colonizar sob as superfícies sólidas, formando biofilmes. Estes formam uma camada protectora diminuindo a exposição da superfície ao ambiente externo. No entanto, isto pode também conduzir à deterioração dos materiais podendo mesmo alterar a função a que o material estava inicialmente destinado (Fang *et al.*, 2002). O crescimento microbiano associado a superfícies, por exemplo a formação de um biofilme, pode estimular o desenvolvimento da bioincrustação (*biofouling*), já que promove reacções físico-químicas não favorecidas em condições abióticas, conduzindo à deterioração do material (Beech, 2003). No caso de materiais metálicos, estas alterações nas características do material, devidas a um biofilme ou a uma capa de bioincrustação, denominam-se biocorrosão ou corrosão microbiana (MIC, *microbially influenced corrosion*) (Beech *et al.*, 2005).

A biocorrosão ou corrosão microbiana é um processo complexo de deterioração de materiais geralmente metálicos, promovido pela actividade de diversos microrganismos, em consequência do seu crescimento e metabolismo (Beech, 2003). Resulta da acção de processos biológicos que ocorrem no interior do biofilme e electroquímicos que ocorrem

na interface deste com o metal, tendo por consequência a sua degradação, isto é, os microrganismos influenciam a corrosão por alteração das condições electroquímicas da interface metal-solução. (Videla *et al.*, 2005). Os microrganismos e os produtos resultantes da sua actividade influenciam as reacções catódicas e anódicas na superfície do metal, criando condições de corrosão (Beech, 2003 e Pimenta *et al.*, 2003).

A corrosão mediada por SRB pode ser atribuída sobretudo aos três factores seguintes: a) formação de biofilmes e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS); b) produção de metabolitos corrosivos como o sulfureto de hidrogénio; e c) despolarização catódica. (Jan-Roblero *et al.*, 2004 e Bernardez *et al.*, 2007)

a) A corrosão mediada por SRB está inequivocamente relacionada com a formação de biofilmes. Os biofilmes são ecossistemas microbianos extremamente complexos, podendo ser constituídos por bactérias, fungos, algas e protozoários. Estes microrganismos produzem substâncias insolúveis – EPS – que aderem à superfície metálica sob a forma de incrustações, permitindo o estabelecimento e manutenção do biofilme. Com a produção de EPS, o crescimento de novas células e adesão de outras, presentes na fase líquida, passa a envolver e a aglutinar novos microrganismos, resultando na colonização da superfície sólida. Estas bactérias que se encontram agregadas, devido ao biofilme, apresentam algumas vantagens sobre as planctónicas, uma vez que se tornam menos vulneráveis à acção de antibióticos e biocidas em geral, bem como se encontram mais protegidas de factores ambientais agressivos. Por outro lado, podem estabelecer-se ambientes simbióticos, facilitando assim a aquisição de nutrientes e a manutenção da espécie (Pereira, 2001 e Xavier *et al.*, 2003).

A complexidade das populações microbianas presentes no biofilme, bem como a sua espessura, criam um gradiente de arejamento através das várias camadas da sua estrutura. Deste modo, são estabelecidas condições adequadas para o desenvolvimento de microrganismos anaeróbios, como as SRB. Os ambientes anaeróbios são criados através do metabolismo microbiano, quer pelo consumo de oxigénio, quer pela secreção de EPS, limitando a difusão do oxigénio até a base do biofilme (Peres, 2006). Peres (2006) na sua tese de mestrado sobre tratamento de águas de resfriamento, refere o gradiente de arejamento diferecial como um dos principais factores que contribuem para a corrosão nestes sistemas. Vários microrganismos como algas, bactérias e fungos



formam depósitos insolúveis que ficam aderidos na superfície metálica sob a forma de biofilmes ou tubérculos. A área coberta pelo biofilme, ou seja, a área menos arejada, funcionará como ânodo, provocando a oxidação do metal. Esta área, deficiente em oxigénio, favorece a proliferação de bactérias anaeróbias, com as SRB. Enquanto isso, a área que está em contato com a água, será o cátodo. Estabelece-se assim uma relação de simbiose entre bactérias aeróbias e anaeróbias sobre a superfície do metal. O desenvolvimento destas bactérias depende de um pH normalmente entre 5,5 e 8,5, presença de sulfato e nutrientes, incluindo matéria orgânica e temperatura entre 25 e 44°C (Peres, 2006)

Os EPS produzidas por SRB, nomeadamente polissacarídeos e proteínas, constituem a matriz do biofilme e contribuem para o processo de biocorrosão, devido à sua capacidade de se ligarem a iões metálicos, promovendo a adesão irreversível de células à superfície do metal (Bernardez *et al.*, 2007). Além disso têm capacidade redutora contribuindo para a redução electroquímica (Chan *et al.*, 2002).

- b) Por outro lado, metabolitos de natureza química diversa, tais como, ácidos, bases, sulfuretos, entre outros, formados pelos microrganismos podem ser corrosivos, uma vez que transformam o meio originalmente inerte em quimicamente activo (Beech, 2003).

No caso das SRB, o sulfureto de hidrogénio resultante da redução de sulfato é um produto metabólico bastante agressivo, que quando dissolvido na água, ataca o ferro formando depósitos de sulfureto de ferro (FeS), de coloração escura (Peres, 2006).

Num relatório efectuado pela indústria química Máscia, em 2003, sobre o tratamento de águas industriais para sistemas geradores de vapor é discutida a necessidade da realização de um tratamento químico adequado para as águas de alimentação das caldeiras e os possíveis problemas devido à formação de incrustações e à corrosão destes sistemas, causados pela falta desse tratamento. De entre os inconvenientes no processo industrial contam-se o sobrequecimento dos tubos, a perda de rendimento, a possível ruptura das tubagens, o maior consumo de combustível, o ataque cáustico e a obstrução ao fluxo de água. Uma das principais formas de corrosão existentes nos geradores de vapor é a corrosão devida ao sulfureto de hidrogénio, que se encontra na água e é originário de meios químicos (poluição) e biológicos. O processo corrosivo por sulfureto de hidrogénio pode ser verificado conforme a seguinte reacção:  $\text{Fe} + \text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{FeS} + \text{H}_2$ . Na presença de oxigénio o sulfureto de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{S}$ ) pode ser oxidado a

ácido sulfúrico, dentro de certas condições de pH e temperatura, o que atacará violentamente o ferro (Mascia, 2003).

No trabalho de Bernardez *et al.* (2007) são discutidos os principais aspectos a serem considerados para selecção de materiais adequados à construção de biorreatores anaeróbicos pressurizados, operando com SRB, para investigar a produção de sulfureto de hidrogénio e a cinética de crescimento destas bactérias. A presença de SRB em biofilmes dos reservatórios e tubagens para o transporte de petróleo e gás é comum, sobretudo, quando o petróleo é originário de locais nos quais é utilizada injeção de água do mar, rica em sulfato, que juntamente com a presença de hidrocarbonetos estimula o crescimento destas bactérias. Nestas condições é favorecida a produção de metabolitos como o sulfureto de hidrogénio. Além disso, as SRB produzem enzimas, ácidos orgânicos e inorgânicos e compostos voláteis como amónia que, juntamente com o sulfureto de hidrogénio, alteram processos electroquímicos na interface com o metal provocando a degradação do material (Bernardez *et al.*, 2007).

- c) A corrosão mediada por SRB pode ainda ser explicada pela despolarização catódica, devido ao consumo de hidrogénio no cátodo, causado pela actividade da enzima hidrogenase, presente nas SRB. Na presença de oxigénio dissolvido as reacções químicas tendem a limpar o hidrogénio da área catódica, promovendo a corrosão (Chan *et al.*, 2002 e Videla *et al.*, 2005). As hidrogenases das SRB permanecem activas dentro da matriz do biofilme, independentemente da ausência de células vivas e pode ter um papel significativo na biocorrosão do ferro e das ligas ferrosas (Beech *et al.*, 2005).

A biocorrosão mediada por SRB afecta várias indústrias, entre as quais as petrolíferas (Jan-Roblero *et al.*, 2004 e Ayazi *et al.*, 2006), do gás (Zhu *et al.*, 2003), da energia, da distribuição e do tratamento de água (Ito *et al.*, 2002 e Icen *et al.*, 2006) e até de engenharia civil (Magalhães, 2007) e construção naval (Jung *et al.*, 2003), entre outras, causando danos nas suas estruturas, como sistemas de refrigeração, tanques, condutas e tubagens, cascos de embarcações, etc.

Os danos causados pelas SRB traduzem-se em elevados prejuízos económicos, sobretudo associados à biocorrosão, mas também em problemas de saúde e segurança.

Para além dos estragos que a incrustação de microrganismos provoca no equipamento, a biocorrosão pode levar à contaminação de produtos de consumo (por exemplo: água e

petróleo), perdas energéticas relacionadas com o aumento de atrito, resistência à transferência de calor e perdas de pressão, o que representa prejuízos significativos para as indústrias (Jass e Walker, 2000). Os prejuízos têm origens muito diversas e podem estar relacionados a paragens das instalações para substituição de estruturas corroídas ou limpezas, remoção de depósitos biológicos em sistemas de armazenamento e tubagens ou ainda com a reparação dos sistemas. Os custos associados à MIC incluem geralmente também os custos da prevenção da MIC e de *biofouling* (Beech *et al.*, 1999).

Por exemplo, dados de 1998, estimaram que os custos directos da corrosão metálica nos Estados Unidos são cerca de 276 biliões de dólares por ano, o que equivale a 3,1% do PIB (Koch *et al.*, 2001). Foram efectuados diversos estudos sobre os custos anuais da corrosão metálica em vários países, incluindo o Reino Unido, Japão, Austrália, Alemanha, Suécia, Finlândia, Índia e China. O ponto comum destes estudos foi que os custos anuais da corrosão variaram de 1 a 5% dos PIBs de cada país (Koch *et al.*, 2001). É difícil quantificar as perdas económicas associadas à biocorrosão, uma vez que muitas delas não são logo identificadas como corrosão microbiológica, mas estima-se que cerca de 20% de todos os danos provocados pela corrosão têm origem no fenómeno de biocorrosão (Pimenta *et al.*, 2003).

Relativamente à indústria do petróleo, a corrosão é a principal causa dos problemas nas tubagens, afectando os custos de produção e armazenamento na indústria petrolífera. Foi estimado que 40% da corrosão das tubagens na indústria petrolífera, podiam ser atribuídos à corrosão microbiológica (Zhu *et al.*, 2003) e que a biocorrosão provoca estragos na ordem dos 100 milhões de dólares, na produção, transporte e armazenamento do petróleo todos os anos nos Estados Unidos (Rajasekar *et al.*, 2007).

Por outro lado, a biocorrosão mediada por SRB pode também ter forte implicação a nível de problemas de segurança e de saúde pública e ambiental, não só devido à acção dos próprios microrganismos, como devido à produção de sulfureto de hidrogénio com elevada toxicidade (Beech *et al.*, 1999). Os problemas ambientais são também sentidos no decurso e em consequência da resolução dos problemas de biocorrosão, como são os casos da utilização de biocidas no controlo dos biofilmes, que pode ser nefasta para o ambiente, ou do recurso a revestimentos *anti-fouling* (anti-incrustantes), que são tóxicos e frequentemente provocam poluição (Videla *et al.*, 2005).

Uma vez que a corrosão mediada por SRB traduz um dos factores de degradação e redução de rendimento de diversas instalações industriais, o seu controlo é um dos objectivos fundamentais, sendo a caracterização das populações microbianas responsáveis pela biocorrosão e das interacções entre diferentes microrganismos com a superfície metálica necessária para implementar estratégias eficientes de detecção, monitorização e controlo (Zhu *et al.*, 2003). Os estudos sobre biocorrosão que envolvem comunidades microbianas naturais obtidas de sistemas industriais são raros. Tais estudos forneceriam uma informação mais útil para a monitorização, o controle e a prevenção da biocorrosão nas indústrias, podendo contribuir para a melhoria do actual problema (Jan-Roblero *et al.*, 2004).

Por outro lado as SRB devido à sua ubiquidade estão presentes em diversos ambientes e indústrias, desempenhando um papel importante, como é o caso da sua utilização na remediação de efluentes industriais. O conhecimento do género ou grupo microbiano dominante no processo de redução do sulfato, sob condições específicas pode ser útil para o desenvolvimento e aplicação de métodos de biorremediação eficazes (Icgen *et al.*, 2006).

O desenvolvimento de métodos rápidos de detecção e quantificação de SRB em ambientes naturais e industriais poderia, por exemplo, auxiliar a optimização da utilização de biocidas no controlo das populações de SRB (Videla *et al.*, 2005).

## 4 Métodos de Detecção e Quantificação de SRB

### 4.1 Métodos clássicos e métodos moleculares

Nos últimos anos foram feitos esforços consideráveis para o desenvolvimento de métodos rápidos para a detecção e enumeração de SRB em ambientes naturais e industriais. Geralmente os métodos utilizados para detectar e enumerar SRB podem ser divididos em duas categorias: métodos clássicos e métodos moleculares (Ben-Dov *et al.*, 2007).

Os **métodos clássicos**, baseados no cultivo de microrganismos, recorrem à realização de testes bioquímicos e fenotípicos que auxiliam na identificação das espécies (Amann *et al.*, 1995). Estes testes, apesar de terem um custo relativamente baixo, apresentam algumas desvantagens:

- Por vezes são demorados devido às taxas lentas de crescimento bacteriano, como é o caso das SRB (Ben-Dov *et al.*, 2007).
- Por outro lado, não fornecem uma avaliação exacta dos tipos e números de bactérias de uma amostra biológica, uma vez que existe uma grande quantidade de bactérias não cultiváveis (Stackebrandt e Embley, 2000). Em vários ambientes, é frequente que a contagem de microrganismos directa ao microscópio exceda a contagem de células viáveis (Amann *et al.*, 1995).
- O tamanho microscópico dos microrganismos e, em muitos casos, a dependência de hospedeiros e substratos específicos para a sua sobrevivência e multiplicação também são limitações dos métodos de cultivo tradicionais (Wagner *et al.*, 1993). No caso das SRB, a necessidade de meios selectivos para o cultivo e o facto dos meios de crescimento laboratoriais não conseguirem reflectir exactamente as condições dos locais onde estas bactérias crescem, podem trazer dificuldades acrescidas (Zhu *et al.*, 2003 e Içgen *et al.*, 2006).
- Para além disso, esta caracterização fenotípica, não fornece informações sobre as relações evolutivas entre os organismos. A identificação de microrganismos é geralmente complexa, daí que uma abordagem clássica, que recorre à caracterização fenotípica e estrutural dos microrganismos pode ser insuficiente.

Algumas destas dificuldades podem ser ultrapassadas recorrendo a outro tipo de métodos – os **métodos moleculares**. Os métodos moleculares, em oposição aos métodos clássicos, utilizam a caracterização de certos genes do genoma bacteriano, permitindo a identificação e monitorização mais eficaz dos microrganismos responsáveis por determinado processo. Além disso, têm vindo a ser desenvolvidas **abordagens moleculares independentes do cultivo**, de forma a caracterizar e estudar a composição de comunidades microbianas (Daly *et al.*, 2000).

Em síntese, os métodos moleculares apresentam algumas vantagens sobre os clássicos:

- São as únicas tecnologias que permitem estudar os microrganismos não cultiváveis presentes numa comunidade microbiana, sendo mais sensíveis (Knight, 2000).
- Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de sequências de DNA encontradas no ambiente.
- Para além disso, os métodos moleculares fornecem informações sobre as relações evolutivas entre os microrganismos (Castro *et al.*, 2000).

Os **métodos moleculares** podem dividir-se em (Icgen *et al.*, 2006):

- **métodos indirectos**, que implicam a extracção de DNA total ambiental, como é o caso da PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e da imunofluorescência. Os métodos indirectos permitem a detecção de grupos microbianos específicos, mas não possibilitam a sua quantificação.
- **métodos directos**, efectuados *in situ*, como o FISH (*Fluorescence in Situ Hybridization*). A aplicação de métodos moleculares directos independentes do cultivo como a tecnologia FISH, para investigar a ocorrência e distribuição de bactérias no ambiente, tem as vantagens de fornecer informação directa sobre a estrutura da comunidade e de serem independentes da extracção do DNA (Icgen *et al.*, 2006, Ben-Dov *et al.*, 2007 e Lückner *et al.*, 2007). São adequados ao estudo da composição e estrutura de comunidades microbianas complexas, tendo maior fiabilidade e sensibilidade.

## 4.2 Métodos moleculares indirectos

### 4.2.1 Métodos moleculares independentes do cultivo baseados na tecnologia PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Os métodos moleculares independentes do cultivo receberam um grande impulso com o desenvolvimento da técnica de PCR. Esta tecnologia, desenvolvida em 1983 pelo geneticista Kary Mullis, permite sintetizar, em poucas horas e *in vitro*, uma grande quantidade de um determinado fragmento de DNA (Loeffelholz e Deng, 2006). Para tal, utiliza reacções em cadeia da enzima polimerase, permitindo obter múltiplas cópias de um fragmento de DNA sem a utilização de um organismo vivo.

Na Figura 4.1 estão representados os principais procedimentos técnicos associados à tecnologia PCR bem como alguns dos métodos moleculares baseados no PCR utilizados para a identificação de microrganismos.

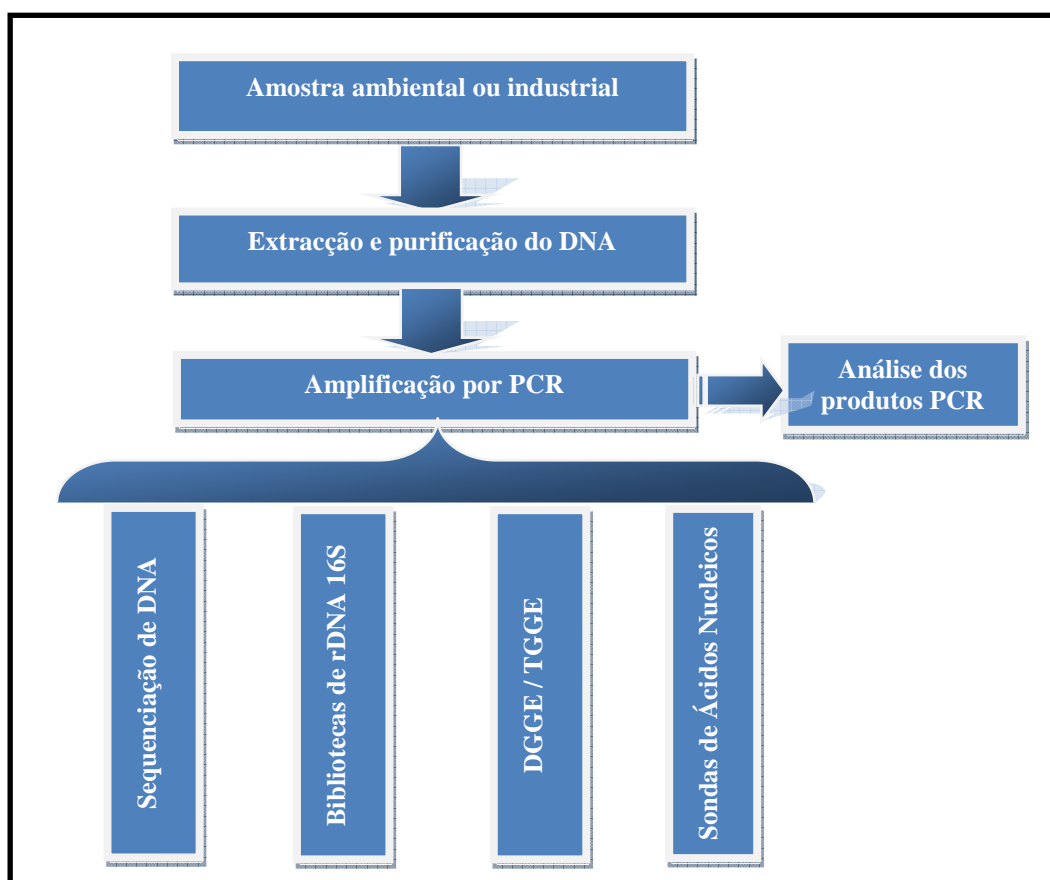


Figura 4.1 – Métodos moleculares baseados no PCR para a identificação de microrganismos, adaptado de Correia, 2007.

#### 4.2.1.1 Extracção e purificação do DNA

A extracção e purificação de DNA de uma amostra são os primeiros passos das metodologias moleculares e têm grande influência na obtenção de resultados.

Antes de qualquer procedimento de análise molecular que utilize o DNA, este tem que ser extraído a partir das células e separado das proteínas e de outros contaminantes celulares. A extracção e purificação do DNA ocorre em três etapas (Madigan *et al.*, 1997d):

1) Lise celular para remover o DNA do interior das células – a solução de lise contém detergente (agente desnaturante) que provoca ruptura das membranas celular e nuclear das células e a enzima proteinase K que degrada as histonas que estão associadas ao DNA, destruindo este complexo. A lise pode ser directa, quando a ruptura das células bacterianas ocorre directamente na amostra ambiental, ou indirecta, que requer um passo inicial de extracção celular, o que pode tornar o procedimento menos eficiente (Gabor *et al.*, 2002 e Chaudhuri *et al.*, 2006);

2) Isolamento do DNA, das proteínas e dos destroços celulares – a adição de uma solução salina, que promove a agregação das proteínas e restantes destroços celulares, juntamente com uma centrifugação, permite obter um sobrenadante com o DNA, separado dos restantes constituintes;

3) Precipitação do DNA – a adição de álcool ao DNA, juntamente com uma centrifugação provoca a agregação do DNA (insolúvel em álcool) que forma um depósito no tubo. Este depósito pode ser posteriormente ressuscitado numa solução estéril e deve ser tratado com RNAases de forma a remover o RNA.

Um dos problemas da extracção de DNA de amostras ambientais tem a ver com a dificuldade de eliminação de contaminantes. Este problema é muito comum nas amostras de solos ou lamas, devido à presença de ácidos húmicos que são difíceis de eliminar e podem inibir a actividade das enzimas na PCR (Gabor *et al.*, 2002).

Existem várias técnicas e protocolos descritas para a extracção de ácidos nucleicos, utilizando substâncias e estratégias diferentes. É recomendável, logo que seja confirmado experimentalmente que um determinado protocolo de extracção é suficientemente eficiente, em termos de rendimento de extracção e depuração adequada para a PCR, usar o mesmo para todas as extracções subsequentes.



Actualmente estão disponíveis comercialmente diversos *kits* para a extracção e purificação de DNA de amostras naturais ou industriais, como por exemplo, o *SoilMaster™ / WaterMaster™ DNA Extraction Kit* e o *MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood* (Biotech Desk) ou o *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas).

#### 4.2.1.2 Amplificação por PCR

A PCR consiste na amplificação de DNA *in vitro* baseada no processo de replicação de DNA que ocorre *in vivo* e utiliza enzimas polimerases bacterianas. Os reagentes necessários para a execução da técnica de PCR são (Videira, 2001a):

- Pequenas quantidades do DNA alvo, de cadeia dupla – servem de molde à síntese de novas cadeias;
- Dois oligonucleótidos iniciadores (*primers*), de cadeia simples, geralmente constituídos por 15 a 30 nucleótidos, obtidos por síntese química – reconhecem as sequências específicas do DNA que pretendem amplificar;
- *Taq* DNA polimerase – enzima termoestável responsável pela síntese e alongamento da nova cadeia de DNA;
- Os quatro desoxirribonucleótidos (dNTPs) constituintes do DNA em concentrações equimolares – blocos de construção para a síntese das novas cadeias;
- Tampão salino;
- Magnésio ( $Mg^{2+}$ ) – cofactor importante para a actividade da *Taq* DNA polimerase;

Esta mistura é introduzida em tubos num termociclador, equipamento que permite programar, de forma contínua e automatizada, os vários ciclos de aquecimento e arrefecimento, e submetida a vários ciclos de amplificação.

Cada ciclo PCR (Figura 4.2) tem 3 etapas (Loeffelholz e Deng, 2006):

- 1) **Desnaturação** do DNA alvo pelo calor, de modo a separar a cadeia dupla em duas cadeias simples que vão servir de molde (tipicamente 1 minuto a 93-94°C);
- 2) **“Annealing”** ou associação dos *primers* por ligações de hidrogénio aos terminais 3’ da sequência específica de cada cadeia molde de DNA. Para permitir essa associação, a mistura de reacção é arrefecida (tipicamente a temperaturas entre 50 e 65°C, durante 1 minuto; a temperatura a usar depende da temperatura de fusão dos *primers* e da percentagem guanina-citosina (% GC) da sequência a amplificar);

- 3) **Extensão** dos *primers* em que a *Taq* DNA polimerase promove a síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, através da adição de dNTPs. (tipicamente 2 minutos a 72°C);

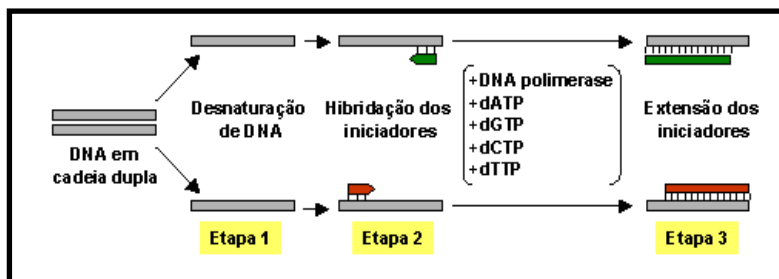


Figura 4.2 – Esquema de um ciclo de amplificação de DNA por PCR (e-escola Universidade Técnica de Lisboa (actualizado em 2005)).

Após vários ciclos de reacções o aumento da quantidade de DNA é previsto por uma exponencial de base 2, ou seja, em cada ciclo é possível aumentar duas vezes a concentração de DNA pré-existente. Por exemplo, após 20 ciclos de amplificação seguidos, uma cadeia é copiada em  $2^{20}$  (Videira, 2001a).

A PCR apresenta determinadas vantagens e aplicações (Lo e Chan, 2006a):

- Como é uma reacção específica pode-se obter a amplificação de sequências de nucleótidos-alvo, mesmo numa amostra com grande diversidade de sequências, permitindo identificar microrganismos específicos numa determinada comunidade complexa, que dificilmente seriam detectados de outro modo.
- A possibilidade de amplificar desta forma as moléculas de DNA permite ainda, a partir de pequenas quantidades, obter material suficiente para estudar e a baixo custo.
- Com a realização de um passo prévio de transcrição reversa, a PCR pode também ser aplicada ao RNA.

Porém a PCR tem também algumas limitações:

- Um dos atributos mais importantes da reacção PCR é a sua elevada sensibilidade. Contudo, um problema que resulta da grande sensibilidade da técnica é tendência para produzir resultados falsos-positivos devido à contaminação exógena causada pelos procedimentos de manipulação (Lo e Chan, 2006b). Se a reacção de PCR for contaminada com DNA estranho, este pode emparelhar com os *primers*, mesmo que só parcialmente e ser amplificado (Videira, 2001a).

Existem quatro fontes principais de contaminação da PCR (Lo e Chan, 2006b):

- 1) produtos de PCR de amplificações anteriores;
- 2) DNA previamente clonado no laboratório;
- 3) processamento da amostra;
- 4) ambiente de laboratório e reagentes utilizados na extracção do DNA e na PCR.

As melhores medidas a tomar são prevenir e monitorizar (por exemplo, utilizando controlos) estas fontes de contaminação.

- Um outro problema é que a *Taq* DNA polimerase não tem a capacidade de correcção comum às DNA polimerases e introduz alguns erros, embora com uma baixa frequência. Estes serão tanto mais amplificados quanto mais precocemente ocorrerem nos ciclos de PCR (Videira, 2001a). Na análise de sequências dos produtos PCR, os erros introduzidos podem dificultar a interpretação de dados, conduzindo a conclusões erradas. Daí que os produtos devam ser analisados e as condições de amplificação cuidadosamente optimizadas (Lo e Chan, 2006a).
- Uma falha comum da PCR é a desnaturação insuficiente (Lo e Chan, 2006a), o que pode ser ultrapassado com um passo de desnaturação inicial – *hot-start* PCR – antes dos ciclos.
- É ainda essencial ter cuidado no desenho dos *primers*. A especificidade de um *primer* pode ser um obstáculo importante, especialmente ao tentar analisar uma mistura de sequências alvo homólogas (Dahllöf, 2002). Um bom *primer* deve ter uma temperatura de fusão entre 52 e 65 °C, ausência de capacidade de dimerização, ausência de locais de ligação secundários e baixa complementaridade na extremidade 3'. Actualmente estão disponíveis diversos programas informáticos que auxiliam no desenho dos *primers* (Lo e Chan, 2006a).

Todas as técnicas baseadas no PCR (clonagem, análise de padrões de bandas e sequenciação) serão afectadas pelos problemas introduzidos pela técnica PCR (Dahllöf, 2002). Apesar disto, as técnicas de PCR têm tido um desenvolvimento notável. As melhorias resultam, não só da existência de novos equipamentos com diversas características, mas também do uso de *Taq* DNA polimerases mais fiáveis, introduzindo menos erros e capazes de amplificar fragmentos com vários kb de DNA (Videira, 2001a).

Actualmente existem diversas técnicas de amplificação de ácidos nucleicos derivadas do PCR, como o *hot-start* PCR, o *nested* PCR, o *multiplex* PCR, o *real-time* PCR, etc

(Loeffelholz e Deng, 2006). O princípio da técnica de *real-time* PCR será explicado à frente.

Grande parte das técnicas moleculares actualmente utilizadas apropriam-se da técnica PCR ou das suas variações para o estudo da diversidade de bactérias nos mais diversos ambientes.

#### **4.2.1.3 Análise dos produtos PCR**

Os produtos obtidos por PCR devem ser fragmentos de DNA de tamanho definido e podem ter diversas aplicações, podendo ser clonados, sequenciados de forma a proceder a identificações e tipagens, etc. Uma vez que nem todas as reacções de PCR têm sucesso, os produtos resultantes do PCR (amplicões) devem ser analisados antes de utilizados numa aplicação, de forma a detectar-se se os amplicões foram realmente formados e se o seu tamanho é o esperado.

A análise pode ser feita por exemplo, através de **electroforese em gel de agarose**. Quando sujeitos a um campo eléctrico, os ácidos nucleicos migram em direcção ao pólo positivo, uma vez que apresentam carga negativa a pH neutro. A agarose funciona como uma rede cujos poros deixam passar mais facilmente as moléculas mais pequenas, que vão portanto migrar mais do que as de maiores dimensões. Desta forma, através da comparação da distância percorrida pelos fragmentos da amostra, com a percorrida por fragmentos de peso molecular conhecido – marcadores de peso molecular – é possível estimar o peso molecular de cada fragmento da amostra a analisar (Loeffelholz e Deng, 2006). As moléculas do mesmo tamanho migram conjuntamente e formam bandas. Estas podem ser visualizadas através da adição de brometo de etídeo, uma substância mutagénica que se intercala nas cadeias de DNA, e que, quando exposta a radiação ultravioleta, emite fluorescência alaranjada (Videira, 2001b e Podzorski *et al.*, 2006). A electroforese em gel de agarose pode ser usada como método de detecção de produtos de PCR embora não deva ser utilizada isoladamente, uma vez que a sequência dos amplicões não pode ser confirmada.

**Outros métodos de análise dos produtos de PCR** são a utilização de mapas de restrição, hibridação de sequências específicas com sondas oligonucleotídicas, clonagem de produtos PCR, espectrometria de massa e imunoensaios enzimáticos (EIA), etc (Lo e Chan, 2006a e Podzorski *et al.*, 2006).

#### 4.2.1.4 Sequenciação de DNA

A sequenciação de DNA é uma técnica que permite determinar a sequência de nucleótidos numa cadeia de DNA. Para o diagnóstico molecular em microbiologia, o método mais preciso para a identificação de um produto de PCR é a determinação da sua sequência (Hong, 2006).

Até há alguns anos atrás, este objectivo era atingido manualmente, utilizando dois métodos diferentes: método químico de *Maxam-Gilbert* e método enzimático de *Sanger* (Madigan *et al.*, 1997d). Estes métodos eram bastante demorados e trabalhosos.

O aparecimento de projectos que envolvem a sequenciação de genomas completos levou ao desenvolvimento de processos de sequenciação automática e actualmente, há aparelhos automatizados que utilizam sistemas de detecção fluorescente para uma visualização eficaz dos produtos das reacções de sequenciação. A introdução de sequenciadores automáticos, veio permitir o tratamento de um elevado número de amostras num curto período de tempo, generalizando a sua utilização (Videira, 2001b).

Actualmente existe um outro método de sequenciação – **Pirossequenciação** – desenvolvido nos anos 90 por Mostafa Ronaghi e Pal Nyrén no *Royal Institute of Technology* em Estocolmo. Esta técnica, também denominada “sequenciação por síntese” é um método enzimático que permite sequenciar uma cadeia simples de DNA através da síntese da cadeia complementar, detectando qual a base incorporada em cada passo. Baseia-se na detecção em tempo real do pirofosfato libertado durante a adição de cada nucleótido na síntese de DNA. Após a incorporação de cada nucleótido, uma cascata de reacções enzimáticas gera uma luz que é analisada e permite determinar qual o nucleótido incorporado (Elahi e Ronaghi, 2004 e Hong, 2006).

A técnica de sequenciação trouxe vantagens e progressos à microbiologia, sendo actualmente utilizada para:

- caracterizar DNAs clonados;
- confirmar a identidade de um clone ou mutação;
- verificar a autenticidade de mutações criadas em laboratório ou de produtos resultantes de PCR para identificação bacteriana;
- identificar polimorfismos genéticos ou mutações em genes de particular interesse, como por exemplo genes que conferem resistência antimicrobiana. (Hong, 2006)

As sequências obtidas podem ainda ser utilizadas para analisar o seu relacionamento filogenético com outras sequências (identificação molecular e taxonomia). O estudo da diversidade microbiana e a análise das comunidades deu um salto em frente desde o advento da sequenciação de DNA, que revolucionou o conhecimento sobre a filogenia microbiana (Dahllöf, 2002). O facto da sequência de algumas regiões do DNA bacteriano ser determinante para identificar os microrganismos, faz com que esta tecnologia seja o método de eleição utilizado para a sua identificação. No que diz respeito à identificação de estirpes bacterianas, a sequenciação de regiões do gene que codifica para a subunidade 16S do RNA ribossomal (rRNA 16S) é actualmente o método mais utilizado (Drancourt *et al.*, 2000). O rápido crescimento de bases de dados de sequências de rDNA, incluindo rDNA 16S, acessíveis via internet torna possível a comparação de sequências encontradas em todo o mundo (Dahllöf, 2002).

A partir da sequenciação de genes pode passar-se à genómica funcional de forma a descobrir a estrutura e função de cada gene (Videira, 2001b).

#### **4.2.1.5 Bibliotecas de rDNA 16S**

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNAs) são os biopolímeros mais adequados para estudos de diversidade, uma vez que os genes que os codificam (rDNAs) estão universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, considerando-se a molécula de maior conservação existente. A sua variabilidade pode apresentar-se em maior ou menor extensão em diferentes regiões da molécula (Madigan *et al.*, 1997e).

O **gene rDNA 16S** codifica para o RNA ribossomial 16S (rRNA 16S) contido na subunidade menor dos ribossomas (30S) dos procariontes. A análise da sequência deste gene é um método útil na microbiologia para a identificação bacteriana, sendo actualmente a abordagem mais comum para a análise de comunidades uma vez que:

- a) os genes têm sequências de nucleótidos altamente conservadas entre várias bactérias;
- b) a conservação ou divergência entre sequências reflecte a evolução bacteriana e a relação filogenética;
- c) cada espécie bacteriana tem a sua sequência única. Desta forma, determinadas regiões do gene que codificam o rRNA 16S são diagnosticantes e permitem identificar microrganismos, para além de serem uma ferramenta útil para o estudo da filogenia bacteriana (Han, 2006). Outra vantagem é a grande quantidade de sequências de rDNA 16S bacterianas disponíveis em bases de dados (Dahllöf, 2002).

Com a utilização da PCR, fragmentos do gene rRNA 16S, presentes em amostras complexas podem ser selectivamente amplificados e clonados. Estes produtos podem ser usados para produzir bibliotecas ambientais de rDNA 16S, permitindo assim, obter informações sobre a diversidade, e também sobre as relações filogenéticas, dos organismos, cultiváveis ou não, presentes no ambiente (Pires *et al.*, 2004). As sequências conservadas facilitam o desenho de *primers* para a amplificação e as regiões variáveis fornecem o poder discriminatório. Após a PCR, as sequências de nucleótidos dos amplicões são determinadas e comparadas com base de dados, de forma a calcular homologias (Han, 2006).

No entanto, a utilização de *primers* para rDNA 16S também pode ter desvantagens:

- As bactérias podem ter mais do que um gene de rRNA 16S (operões) no seu cromossoma, podendo variar muito o número de operões de espécie para espécie.
- Para além disso, estas cópias podem apresentar grande heterogeneidade na sua sequência (Tourova, 2003). A heterogeneidade do rRNA 16S entre múltiplas cópias dentro da mesma espécie pode causar problemas na interpretação da diversidade obtida a partir de uma biblioteca de clones ou de sequências de um padrão de bandas e nas conclusões relativas à diversidade e abundância (Dahllöf, 2002 e Janda *et al.*, 2007).
- Este gene também carece de resolução ao nível da espécie. Algumas espécies dentro de um género ou mesmo de géneros diferentes podem ter sequências idênticas do gene rRNA 16S, o que torna difícil a diferenciação e classificação baseada unicamente na sua sequenciação (Han, 2006). A sequenciação deste gene tem baixo poder filogenético ao nível da espécie e da subespécie e pobre poder discriminatório para alguns géneros, sendo necessários estudos complementares de hibridação de DNA para fornecer resolução absoluta para estes problemas taxonómicos (Janda *et al.*, 2007).

Além de genes ribossomais, alguns **genes funcionais** de determinados grupos de microrganismos, também têm sido utilizados para a sua caracterização filogenética, como por exemplo os genes *dsrA* e *apsA* das SRB, que podem funcionar como marcadores filogenéticos deste grupo de bactérias e podem ser muito úteis especialmente quando se investigam relações estruturais-funcionais (Ben-Dov *et al.*, 2007).

#### **4.2.1.6 DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)**

A electroforese em gel por acção de um campo eléctrico é frequentemente utilizada para separar e estimar o tamanho de fragmentos de ácidos nucleicos. Geralmente, a electroforese de DNA é realizada em gel de agarose. A principal limitação da electroforese em gel de agarose é o facto de não permitir distinguir fragmentos com o mesmo tamanho, mas com diferentes sequências.

As técnicas de DGGE e TGGE permitem analisar produtos de PCR de acordo com a sua sequência de pares de bases e não baseado em diferenças no tamanho dos produtos. Desta forma, permitem a determinação da diversidade genética de comunidades microbianas naturais e também a identificação filogenética dos microrganismos dessas comunidades (Muyzer *et al.*, 1993).

A **electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)** é um método de separação electroforético baseado em diferenças no comportamento de desnaturação de fragmentos de DNA de cadeia dupla (Muyzer *et al.*, 1993). Baseia-se no facto de moléculas de DNA de igual tamanho e com sequências diferentes migrarem de forma diferente em géis de poliacrilamida, a temperatura constante (geralmente 60°C), com gradientes desnaturantes, obtidos por adição de desnaturantes químicos como a ureia e a formamida. A sequência de nucleótidos de um fragmento de DNA definirá a posição do gradiente em que o DNA de cadeia dupla passa a cadeia simples e interrompe a sua migração no gel (Eyers *et al.*, 2004).

A **electroforese em gel com gradiente de temperatura (TGGE)** é uma variação da técnica de DGGE, que utiliza um gradiente térmico com concentração constante de ureia e formamida. Com o aumento da temperatura as ligações de hidrogénio que ligam as cadeias de DNA rompem e estas começam a separar-se. A técnica baseia-se no facto da mobilidade da molécula de DNA diminuir à medida que as duas cadeias se separam e a temperatura exacta a que as cadeias se separam depende da sequência de nucleótidos (Eyers *et al.*, 2004).

Estas técnicas representam uma poderosa ferramenta para estudos ecológicos com microrganismos, dado que moléculas de DNA com sequências diferentes apresentam taxas de migração diferentes nestes géis. Entre as possíveis aplicações destas técnicas estão:



- a separação de fragmentos de DNA de interesse, como o gene que codifica para o rRNA 16S, previamente amplificados, a partir de uma amostra complexa, de forma a que cada banda no gel corresponderá a um microrganismo presente na comunidade em estudo, representando um filotipo. Sendo assim, a cada comunidade microbiana corresponde um padrão de bandas que lhe é característico e a identifica. Do mesmo modo, fazendo uma análise de determinada comunidade em diferentes momentos, podem obter-se diferenças no padrão de bandas que correspondem a alterações na diversidade e composição da comunidade microbiana (Eyers *et al.*, 2004). A análise destas alterações pode constituir uma ferramenta útil na monitorização de processos industriais (Jan-Roblero *et al.*, 2004 e Dar *et al.*, 2005).
- a recuperação, a partir do gel, do DNA de cada banda isoladamente e proceder à sequenciação desse fragmento de DNA de modo a identificar o microrganismo. Pode ainda proceder-se à identificação por hibridação com sondas específicas (Muyzer *et al.*, 1993).

As análises DGGE/TGGE apresentam algumas limitações (Eyers *et al.*, 2004).:

- O modo como a amostra é armazenada pode afectar a comunidade microbiana. Por exemplo o armazenamento em condições anaeróbicas ou aeróbicas ou o congelamento directo das amostras pode resultar em diferentes comunidades microbianas;
- Formação de produtos inespecíficos durante a PCR, por exemplo a formação de molécula quiméricas, que são compostas por partes das duas sequências originadas a partir dos moldes com uma elevada similaridade. Estes moldes competem com os *primers* durante a fase de *annealing* do PCR. A formação destas moléculas pode afectar a interpretação dos padrões DGGE/TGGE e conduzir a uma sobreavaliação de espécies microbianas;
- A análise de padrões pode ser ambígua quando são analisadas comunidades muito complexas. Estima-se que apenas as populações bacterianas presentes em mais do que 1% na comunidade podem ser detectadas por PCR-DGGE. Esta limitação pode ser ultrapassada através da utilização de *primers* específicos para determinados grupos.

#### 4.1.2.7 Sondas de ácidos nucleicos

A utilização de sondas moleculares é um método versátil que permite, não só o estudo de organismos isolados e cultivados, como também o seu estudo em amostras ambientais. Uma sonda consiste num fragmento marcado de DNA ou RNA complementar à sequência de um gene alvo de interesse. Em condições controladas ocorre a hibridação entre a sonda e a sequência alvo. A detecção da sequência do gene-alvo depende do sistema de marcação da sonda, que pode apresentar nucleótidos marcados radioactivamente (por exemplo,  $^{32}\text{P}$  ou  $^{35}\text{S}$ ) ou não (moléculas fluorescentes ou enzimas) (Madigan *et al.*, 1997d).

Podem ser construídas sondas de ácidos nucleicos para detecção de genes específicos por hibridação e assim permitir a identificação de microrganismos com genoma correspondente. Algumas sondas que têm sido usadas empregam as sequências de rDNA 16S como ferramentas para diferenciar microrganismos em ambientes naturais (Madigan *et al.*, 1997e). A combinação do PCR com utilização de sondas aumenta significativamente a sensibilidade dos protocolos de detecção (Lo e Chan, 2006a).

Uma das tecnologias que utiliza sondas de ácidos nucleicos é o ***Southern Blotting***, que permite a detecção de moléculas de DNA, após a sua separação electroforética, por hibridação com um sonda cuja sequência é complementar à desse DNA (Videira, 2001b). O gel onde é feita a electroforese de DNA é tratado com uma solução alcalina, tipicamente contendo hidróxido de sódio, para promover a desnaturação da cadeia dupla do DNA, separando-a em cadeias simples. A desnaturação é necessária porque o DNA nas etapas seguintes irá aderir à membrana e irá emparelhar com a sonda. Após a desnaturação é feita a transferência por capilaridade do DNA do gel para uma membrana de nitrocelulose ou de nylon – *blotting*. As cadeias simples de DNA ligam-se à membrana na mesma posição que ocupavam no gel. Depois de obtida a réplica do gel, esta pode ser submetida a técnicas de hibridação com sondas marcadas (Harvey e Soundy, 2005).

Trata-se de uma técnica bastante sensível e com muitas aplicações, permitindo:

- detectar um fragmento de DNA único, de entre misturas complexas de fragmentos que resultam do corte do DNA genómico com enzimas de restrição;
- distinguir estirpes diferentes de um microrganismo, que diferem na sua constituição genética;
- detectar organismos patogénicos através da detecção da presença de genes característicos, tais como os genes envolvidos na síntese de toxinas;

- identificar genes homólogos ou similares de diferentes microrganismos, usando como sonda, um gene de um dado organismo. (Videira, 2001b)

#### 4.2.2 *Real-time PCR*

O *Real-time PCR* também chamado *Quantitative Real-time PCR* ou *Kinetic PCR*, desenvolvido no início dos anos 90, é uma tecnologia baseada no PCR que é usada para amplificar e simultaneamente quantificar uma molécula alvo de DNA. Permite quer a detecção, quer a quantificação de uma sequência específica numa amostra de DNA (Mackay, 2007).

O procedimento segue o princípio geral da reacção PCR. Porém esta tecnologia permite a monitorização da reacção PCR em tempo real, uma vez que a colheita de dados é efectuada durante a fase exponencial, isto é, à medida que o DNA amplificado se acumula após cada ciclo de amplificação. A detecção é efectuada por fluorescência produzida por moléculas repórter, podendo ser:

- a) detecção não específica, como é o caso do *SYBRGreen*, que é um corante repórter que emite fluorescência quando intercalado com a cadeia dupla de DNA;
- b) detecção específica, como a tecnologia FRET, que utiliza sondas oligonucleotídicas específicas (por exemplo: *Molecular beacons*, Sondas *TaqMan*), que emitem fluorescência quando hibridam com a sequência complementar do amplicão formado.

Em qualquer dos casos, o aumento do sinal de fluorescência é proporcional ao número de amplicões formado (Qin, 2006).

A tecnologia *Real-time PCR* substituiu o PCR convencional em vários campos devido à sua velocidade, sensibilidade e redução da possibilidade de contaminação, apresentando ainda outras vantagens:

- Por um lado, verificou-se que no PCR convencional, as quantidades variáveis de amostra normalmente não resultavam em diferenças discerníveis na quantidade de DNA amplificado. Uma vez que as condições se tornam menos favoráveis nos últimos ciclos, devido à inactivação enzimática e a inibidores como o pirofosfato, a curva de amplificação tem uma fase de *plateau*. É durante esta fase, na qual as amplificações alcançam essencialmente a mesma quantidade de DNA amplificado,

que a reacção é medida utilizando tecnologias como a electroforese em gel ou métodos imunoenzimáticos. Desta forma, é apenas na fase exponencial de amplificação que o processo de PCR reflecte a quantidade de sequência alvo adicionada. No PCR em tempo real a colheita de dados é efectuada durante a fase exponencial, isto é, à medida que o DNA amplificado se acumula após cada ciclo de amplificação (Mackay, 2007).

- Por outro lado, a substituição da detecção baseada na electroforese em gel permite reduzir o risco de contaminação, uma vez que toda a reacção, incluindo a detecção, ocorre em recipientes fechados. A utilização de sondas oligonucleóticas para a detecção permite ainda aumentar a especificidade (Mackay, 2007).
- Esta técnica pode ser combinada com a transcrição reversa do RNA (RT-PCR) para determinar a baixa quantidade de RNA mensageiro (mRNA), permitindo quantificar a expressão génica relativa num determinado momento ou em certos tipos de tecidos ou células (Qin, 2006 e Mackay, 2007).

### 4.3 Métodos moleculares directos

#### 4.3.1 FISH (*Fluorescence in situ hybridization*)

O FISH ou hibridação *in situ* por fluorescência é uma técnica citogénica que pode ser usada para detectar e localizar a presença de sequências específicas de ácidos nucleicos nas células. Utiliza sondas fluorescentes que se ligam somente às regiões que apresentam uma sequência com alto grau de similaridade. A microscopia por fluorescência pode ser usada para encontrar o local de ligação da sonda fluorescente na célula (Tate e Ostroff, 2002).

A técnica FISH tem diversas etapas:

- 1) **Construção das sondas**, devendo estas ter um tamanho adequado, sendo suficientemente longas para hibridar especificamente com o seu alvo e evitar sequências semelhantes, mas não tão longas que impeçam o processo de hibridação (Tate e Ostroff, 2002). Se a sequência do gene de interesse é conhecida, podem ser produzidas sinteticamente sondas oligonucleotídicas. Mais frequentemente, os moldes para as sondas são produzidos a partir do isolamento de uma sequência de interesse do DNA nativo e clonagem do fragmento em plasmídeos para produzir quantidades suficientes de DNA para marcar.

- 2) **Marcação das sondas** a usar na reacção de hibridação *in situ*.

As sondas de DNA são marcadas recorrendo a diversas técnicas, como o PCR ou a *Nick translation*, por incorporação de nucleotídeos marcados nas cadeias de DNA. Podem utilizar-se vários marcadores como a digoxigenina (DIG), a biotina ou a fluoresceína. As sondas marcadas com DIG ou biotina são visualizadas com microscópio de fluorescência, após a hibridação e detecção com anticorpos contra DIG ou biotina, enquanto que as sondas marcadas com fluoresceína podem ser usadas utilizando um microscópio de fluorescência, imediatamente após o protocolo de hibridação *in situ*. A detecção com anticorpos acrescenta uma sensibilidade adicional ao processo (Tate e Ostroff, 2002 e Levsky *et al.*, 2003).

As sondas de RNA também podem ser marcadas e utilizadas para o FISH. Estas devem ser produzidas por transcrição *in vitro* a partir do molde de DNA. Como o RNA é mais sujeito a degradação do que o DNA, é mais complexo trabalhar, devendo os reagentes e materiais estar completamente livres de RNAases. Uma das

vantagens das sondas de RNA é que os híbridos RNA-RNA são mais estáveis do que os híbridos DNA-RNA ou DNA-DNA (Tate e Ostroff, 2002).

- 3) **Preparação e permeabilização das células ou tecidos** para a penetração das sondas (Tate e Ostroff, 2002 e Yang, 2006).

As sondas FISH bacterianas são frequentemente *primers* para a região do rRNA 16S.

Particularmente, foram desenhadas sondas de oligonucleotídeos para alvos de rRNA 16S de grupos específicos de SRB e têm-se demonstrado ferramentas úteis para estudos de hibridação de grupos e géneros específicos de populações de SRB em comunidades complexas como biofilmes, sedimentos marinhos, esteiras microbianas, sem isolamento prévio dos microrganismos-alvo. (Icgen *et al.*, 2006).

O FISH utilizando sondas para alvos de rRNA 16S permite:

- a identificação filogenética de microrganismos em comunidades complexas, sem a necessidade de recorrer ao cultivo prévio.
- analisar a estrutura de comunidades bacterianas e seguir a dinâmica espacial e temporal de populações bacterianas individuais no seu habitat (Pernthaler *et al.*, 2001).
- fornecer uma avaliação da actividade microbiana, quando combinado com métodos adicionais de quantificação das células, uma vez que, as condições ambientais influenciam o conteúdo de rRNA nas células, podendo a quantidade de rRNA correlacionar-se com a taxa de crescimento.

O FISH permitiu significativos avanços na definição, rapidez e segurança, tendo inúmeras vantagens:

- Pode ser usada em células bacterianas intactas não sendo necessários procedimentos de extracção e purificação de ácidos nucleicos que podem ser selectivos e redutores. Técnicas de hibridação em células intactas, utilizando sondas oligonucleotídicas marcadas fluorescentemente para alvos de rRNA, permitem não só a detecção de bactérias específicas ao nível de uma célula isolada, mas também a determinação da sua abundância em comunidades complexas (Amann *et al.*, 1995).
- É uma alternativa aos métodos que utilizam a marcação radioactiva.
- Possibilita a detecção simultânea de múltiplos alvos, a análise quantitativa e a visualização de células vivas (Levsky *et al.*, 2003).

- Ao contrário da maioria das outras técnicas usadas para estudar cromossomas, o FISH também pode ser realizado em células que não estão em divisão – Interfase-FISH.

A técnica FISH tem inúmeras aplicações na medicina e na biologia:

- **Estudos clínicos**, para identificar agentes patogénicos que infectam tecidos ou fluídos dos pacientes. Muitas bactérias não crescem bem em condições laboratoriais e, desta forma, o FISH pode ser usado para detectar directamente a presença do patógeno suspeito numa pequena amostra de tecido de um paciente (Hogardt *et al.*, 2000). Para além do diagnóstico clínico pode ser usada na monitorização de doenças (Eiben *et al.*, 1999 e Pack e Zhuang, 2000).
- **Ecologia microbiana**, para identificar microrganismos. A técnica FISH não só permite a identificação e enumeração, mas pode ainda revelar o arranjo espacial dos microrganismos no seu ambiente natural, por exemplo num biofilme (Amann *et al.*, 1995 e Lückner *et al.*, 2007).
- **Comparação de genomas** de espécies diferentes de forma a deduzir relações filogenéticas e é uma técnica particularmente importante para mapear genes e identificar anomalias cromossómicas (Okada *et al.*, 2001 e Gutiérrez *et al.*, 2003).

Apesar de tudo, esta técnica também pode apresentar algumas limitações, entre as quais (Tate e Ostroff, 2002):

- Necessidade de conhecimento prévio da sequência alvo na definição das sondas, com consequente dependência da informação que existe nas bases de dados;
- Sensibilidade baixa, se o número de sequências alvo for reduzido (Chaves, 2005);
- Elevado *background* como a autofluorescência;
- Coloração não específica, que pode ser devida à ligação não específica da sonda ou à ligação não específica do anticorpo usado para visualizar a sonda;
- Problemas de especificidade, relacionados com a hibridação das sondas e a posterior detecção.

## 5 Casos de Estudo de Detecção e Quantificação de SRB

Dada a relevância das SRB na ecologia microbiana e em alguns processos industriais, diversos métodos moleculares independentes do cultivo foram utilizados para estudar as populações de SRB em vários ecossistemas naturais e industriais. Daqui resultou, para além de um aumento do conhecimento da sua diversidade, uma possibilidade de melhorar a monitorização destas bactérias nos sistemas industriais.

O isolamento e identificações bacterianas são demorados e proibitivos para estudos em grande escala. Isto é especialmente verdadeiro quando se investiga SRB usando técnicas de cultivo, uma vez que é exigido que a amostra seja processada rapidamente, assim como são necessárias técnicas anaeróbicas especializadas. Entretanto, os desenvolvimentos actuais na análise molecular superaram muitas destas limitações e o desenho e emprego de sondas e *primers* cuidadosamente avaliadas trouxeram um valor na identificação bacteriana nas comunidades microbianas complexas.

*Primers* para amplificação de genes alvo de rRNA 16S (Daly *et al.*, 2000) e sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S de SRB (Amann *et al.*, 1990; Amann *et al.*, 1992; Devereux *et al.*, 1992; Fukui *et al.*, 1999; e Daly *et al.*, 2000) têm sido usados, respectivamente, em análises de PCR e no FISH para detectar sub-grupos filogenéticos de SRB numa grande variedade de ambientes.

Genes que codificam enzimas importantes no ciclo do enxofre, tais como os genes *dsrAB* e *apsA*, que codificam, respectivamente, para as enzimas redutase dissimilatória do sulfato e redutase adenosina-5'-fosfosulfato (APS redutase), também foram usados na construção de *primers* para detectar SRB em diversos ambientes (Wagner *et al.*, 1998; Friedrich, 2002; e Ben-Dov *et al.*, 2007).

Recentemente foi desenvolvido um DNA *microarray* (*microchip*) adequado para a análise da diversidade de SRB e foi aplicado para detecção em amostras ambientais complexas (Loy *et al.*, 2002).

De seguida são apresentados três estudos de detecção e quantificação de SRB.



### **5.1 Abordagem *nested*-PCR-DGGE para determinar a diversidade de SRB em comunidades microbianas complexas (Dar *et al.*, 2005)**

Como referido no capítulo 4.2.1.6 a análise DGGE de fragmentos de DNA amplificados por PCR é uma ferramenta molecular e tem sido utilizada para determinar a presença e distribuição de SRB em ambientes naturais e industriais (Jan-Roblero *et al.*, 2004 e Gothwal *et al.*, 2007). Nesse mesmo capítulo referiu-se também que o padrão de bandas obtido por esta análise, representa sobretudo os componentes maioritários da comunidade analisada, ou seja, espécies presentes em menos de 1% da população total não são detectadas por este método molecular (Muyzer *et al.*, 1993).

Para ultrapassar a dificuldade em detectar baixos números de SRBs nas comunidades bacterianas, Dar *et al.* (2005) utilizaram a abordagem *nested*-PCR-DGGE como metodologia para estudar, com elevada resolução, a diversidade de SRB em amostras contendo comunidades microbianas complexas. Para este fim, utilizaram-se amostras de biorreactores industriais. Esta abordagem consiste em três fases de amplificação:

- 1º- Uma primeira amplificação usando *primers* bacterianos para amplificar o gene praticamente completo que codifica para o rRNA 16S;
- 2º- O produto obtido é usado numa segunda amplificação usando *primers* para grupos específicos de SRB;
- 3º- Por fim, realiza-se uma última amplificação para criar produtos adequados à análise DGGE (Dar *et al.*, 2005).

Neste trabalho utilizaram-se duas estratégias:

- 1 - **Análise PCR-DGGE** (uma etapa);
- 2 - **Análise *nested*-PCR-DGGE** (três etapas). Esta última estratégia foi utilizada com o objectivo de detectar SRB em comunidades microbianas complexas de lamas anaeróbicas de biorreactores industriais de tratamento de águas residuais.

A comparação dos resultados destas duas estratégias permitiu inferir sobre a proporção de SRB presentes na comunidade bacteriana total das amostras dos biorreactores.

### Esquema experimental

Numa primeira fase do trabalho de Dar *et al.* (2005) foi realizada a amplificação do gene do rRNA 16S de SRB das amostras de lamas. Foram efectuadas amplificações directas e indirectas com os *primers* para grupos específicos de SRB.

Em cada reacção da PCR utilizou-se um controlo positivo com uma estirpe de referência. Foram utilizadas como referência para este estudo 6 estirpes representando os principais grupos filogenéticos de SRB e que estão identificadas na Tabela 5.1.

Na Figura 5.1 está representado o esquema experimental para a amplificação do gene do rRNA 16S de SRB, seguido por Dar *et al.* (2005).

Na segunda fase procedeu-se à análise da diversidade de SRB através de duas estratégias: **PCR-DGGE** (uma etapa) e **nested-PCR-DGGE** (três etapas). Seguiu-se a sequenciação das bandas excisadas dos géis DGGE e procedeu-se à identificação e à construção de filogenias.

Em cada reacção PCR utilizou-se igualmente um controlo positivo com as mesmas estirpes de referência, identificadas na Tabela 5.1. Na Figura 5.2 está representado o esquema experimental da análise da diversidade de SRB por DGGE, seguido por Dar *et al.* (2005).

Cada tubo de reacção PCR continha 2 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 2 µL de cada dNTP (10 mM), 10 µL de tampão 10xPCR (HT Biotech), 0,2 µL BSA 10% (p/v), 1 Unidade Super*Taq* polimerase (HT Biotech), 100 ng de DNA e cerca de 85 µL de água destilada (Daly *et al.*, 2000)

Os *primers* oligonucleotídeos usados neste estudo estão representados na Tabela 5.1: os oligonucleotídeos DFM140 a DSV838 são específicos para o gene do rRNA 16S, dos diferentes grupos filogenéticos de SRB, e foram desenhados por Daly *et al.* (2000); o par de *primers* GM3F/GM4R amplifica a sequência quase completa do gene do rRNA 16S dos membros do domínio bacteria (Muyzer *et al.*, 1995); a combinação dos *primers* 341F(GC)/518R é usada para a amplificação de genes do rRNA 16S adequados para a análise por DGGE (Muyzer *et al.*, 1993).

Tabela 5.1 – Primers PCR e programa usados no estudo de Dar *et al.* (2005).

Nome	Sequência (5' – 3')	Tamanho (bp)	Sequência alvo <sup>1</sup>	Grupo alvo	Tamanho do produto de amplificação (bp)	Temperatura de annealing (°C)	Controlo positivo (+)	Referência
DFM140	TAGMCYGGGATAACRSYKG	19	140-158	<i>Desulfotomaculum</i>	700	58	(+) <i>Desulfotomaculum nigrifican</i> (DSM574)	Daly <i>et al.</i> , 2000
DFM842	ATACCCSCWWCWCCTAGCAC	20	823-842					
DBB121	CGCGTAGATAACCTGTCTCATG	23	121-142	<i>Desulfobulbus</i>	1120	66	(+) <i>Desulfobulbus propionicus</i> (DSM2032)	
DBB1237	GTAGKACGTGTGTAGCCCTGGTC	23	1215-1237					
DBM169	CTAATRCCGGATRAAGTCAG	20	169-183	<i>Desulfobacterium</i>	840	64	(+) <i>Desulfobacterium autotrophicum</i> (DSM3382)	
DBM1006	ATTCTCARGATGTCAAGTCTG	21	986-1006					
DSB127	GATAATCTGCCTTCAAGCCTGG	22	127-148	<i>Desulfobacter</i>	1150	60	(+) <i>Desulfobacter postgatei</i> (DSM2034)	
DSB1273	CYYYYYGCRRAAGTCGSGCCCT	22	1252-1273					
DCC305	GATCAGCCACACTGGRACCTGACA	23	305-327	<i>Desulfonema-Desulfosarcina-Desulfococcus</i>	860	65	(+) <i>Desulfosarcina variabilis</i> (DSM2060)	
DCC1165	GGGGCAGTATCTTYAGAGTYC	21	1144-1165					
DSV230	GRGYCYGCGTYTCATTAGC	19	230-248	<i>Desulfovibrio-Desulfomicrobium</i>	610	61	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> (DSM644)	
DSV838	SYCCGRCA YCTAGYRTYCATC	21	818-838					
GM3F	AGAGTTTGATCMTGGC	16	8-24	Domínio Bacteria	1500	45	(+) <i>E. coli</i>	Muyzer <i>et al.</i> , 1995
GM4R	TACCTTGTTACGACTT	16	1492-1507					
341F(GC)	CCTACGGGAGGCAGCAG (com cauda de 40 bp de GC no terminal 5': CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGG GGCGGGGGGCCGGGGGG)	17	341-357	Domínio Bacteria	193	65-55	(+) <i>E. Coli</i>	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG	17	518-534					

(1) Posição no rDNA 16S de acordo com a numeração em *E. coli*

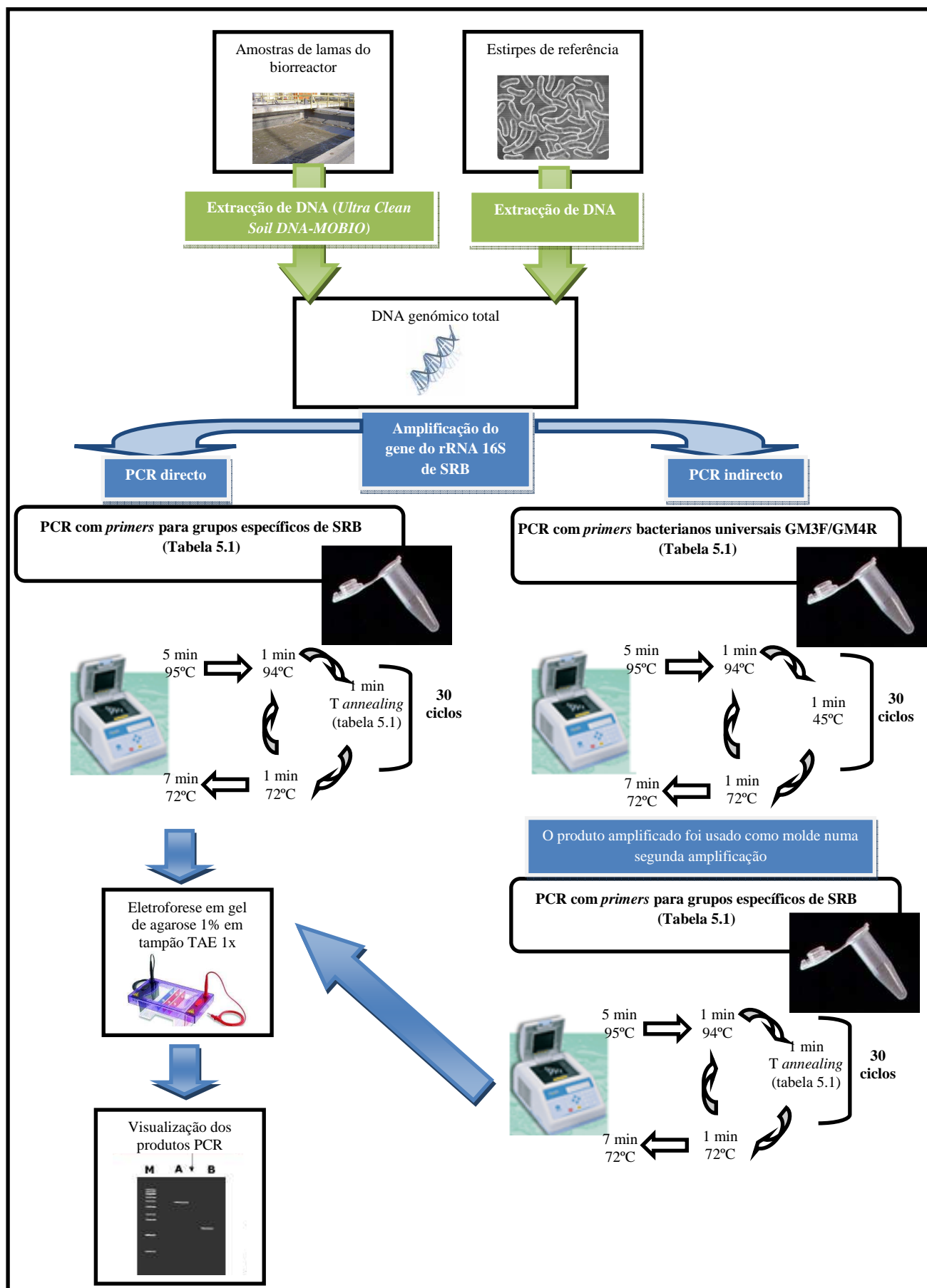


Figura 5.1 – Esquema experimental da amplificação do gene do rRNA 16S de SRB de amostras ambientais.

**Análise PCR-DGGE (uma etapa)**

DNA genômico total

**PCR com primers universais DGGE**  
341F(GC)/518R (Tabela 5.1)

5 min 95°C → 1 min 94°C → 1 min 65-55°C → 1 min 72°C → 7 min 72°C (20 ciclos)

DGGE - 6% (m/v) poliacrilamida, gradiente desnaturante (100% - 7M ureia e 40% formamida, v/v) de 35 a 75%, em tampão TAE 1x, a 60°C

Visualização do perfil de DGGE.

Excisão e reamplificação das bandas individuais

Sequenciação

Construção de filogenias e identificação

**Análise nested-PCR-DGGE (três etapas)**

DNA genômico total

**PCR com primers universais**  
GM3F/GM4R (Tabela 5.1)

5 min 95°C → 1 min 94°C → 1 min 45°C → 1 min 72°C → 7 min 72°C (30 ciclos)

O produto amplificado foi usado como molde numa segunda amplificação

**PCR com primers para grupos específicos**  
de SRB (Tabela 5.1)

5 min 95°C → 1 min 94°C → 1 min T annealing (Tabela 4.1) → 1 min 72°C → 7 min 72°C (30 ciclos)

O produto amplificado foi usado como molde numa terceira amplificação

**PCR com primers universais DGGE**  
341F(GC)/518R (Tabela 5.1)

5 min 95°C → 1 min 94°C → 1 min 65-55°C → 1 min 72°C → 7 min 72°C (20 ciclos)

## **Resultados**

### **Amplificação usando *primers* para grupos específicos de SRB:**

Através do **PCR directo**, a amplificação de DNA genómico só foi possível com os *primers* específicos para membros do grupo *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*.

Com a amplificação por **PCR indirecto**, foram obtidos, para além de produtos correspondentes ao grupo *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, produtos adicionais, correspondentes a *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*.

### **Análise da diversidade de SRB:**

Na primeira estratégia – **análise PCR-DGGE (uma etapa)** – o padrão DGGE obtido permitiu inferir sobre a diversidade global de bactérias dentro de cada amostra. Apenas algumas bandas foram detectadas, as quais representam os grupos bacterianos dominantes nessa amostra. Somente uma banda de fraca intensidade foi identificada como pertencente a SRB numa amostra, indicando que as SRB não estavam entre os membros dominantes da comunidade dos reactores, o que é consistente com os resultados da amplificação directa usando *primers* para grupos específicos de SRB.

Na segunda estratégia – **análise nested-PCR-DGGE (três etapas)** – o padrão DGGE obtido consistiu apenas em bandas de SRB, já que se usaram *primers* específicos para SRB na segunda etapa de amplificação. O maior número de bandas foi observado nos padrões DGGE de produtos obtidos com *primers* específicos para o grupo *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*, indicando uma grande diversidade destas SRB. Para além disso, membros de outros grupos filogenéticos de SRB, isto é, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* foram detectados. As bandas correspondentes a *Desulfobacterium* e *Desulfobacter* não foram detectadas nas amostras dos biorreactores.

## Discussão

### Amplificação usando *primers* para grupos específicos de SRB:

Comparando os resultados obtidos por amplificação directa e indirecta é possível inferir sobre a abundância relativa dos grupos de SRB em amostras ambientais contendo comunidades microbianas complexas. Conclui-se que os grupos detectados simultaneamente pelos métodos directo e indirecto eram os dominantes (neste caso, os membros do grupo *Desulfovibrio-Desulfomicrobium*), enquanto que os grupos somente detectados pelo método indirecto (membros pertencentes aos grupos *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus* e *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina*) estariam presentes em baixo número. A obtenção de produtos de amplificação no PCR indirecto (*nested-PCR*) é resultado da amplificação de quantidades suficientes de DNA, mesmo dos grupos presentes em baixo número, que serviram como DNA molde para a segunda amplificação (*nested-PCR*). Outro factor que também pode contribuir para a amplificação é a diluição de substâncias inibitórias como os ácidos húmicos presentes na amostra (Dar *et al.*, 2005).

Estes resultados são reforçados por outros estudos. Por exemplo, Daly *et al.* (2000) fez observações semelhantes quando estudava as populações de SRB em aterros lixiviados, usando *primers* para grupos específicos de SRB. Estes *primers* detectaram três dos seis grupos de SRB, usando o PCR directo, enquanto que dois grupos adicionais foram detectados quando foi aplicado o *nested-PCR* (Daly *et al.*, 2000).

Pode concluir-se, portanto, que a comparação das análises por amplificação directa e indirecta, utilizando *primers* para grupos específicos de SRB, é útil no estudo da abundância relativa dos grupos de SRB numa amostra.

### Análise da diversidade de SRB:

As duas estratégias utilizadas baseadas na análise DGGE permitiram o estudo da diversidade microbiana de uma comunidade complexa de lamas anaeróbicas de biorreactores industriais de tratamento de águas residuais. Os resultados das duas estratégias apresentaram correspondência com as amplificações directa e indirecta.

Na primeira estratégia (**PCR-DGGE**), a análise por DGGE dos produtos da PCR obtidos com *primers* de eubactérias, conduziu à detecção sobretudo dos principais constituintes da comunidade analisada e apenas uma banda de fraca intensidade foi

identificada como pertencente a SRB. Foram desvalorizados os constituintes menos abundantes mas, potencialmente, espécies importantes para os processos que se analisam. Por exemplo, Jan-Roblero *et al.* (2004) realizaram um estudo sobre a actividade corrosiva de um consórcio desenvolvido a partir de um biofilme isolado numa conduta de gás de uma indústria petrolífera no Golfo do México. Neste estudo, aplicaram a análise DGGE, na qual os produtos de PCR foram as regiões variáveis do gene rDNA 16S, para inferir a composição microbiana da comunidade e observar alterações em diferentes locais e épocas. Somente uma espécie de SRB (*Desulfovibrio vulgaris*) foi detectada através desta análise e, por outro lado, verificou-se através de microscopia electrónica de varrimento (ESEM) que as SRB eram pouco abundantes, podendo algumas espécies ter sido subestimadas pela análise DGGE. No entanto apesar da sua baixa abundância foi possível estabelecer uma relação importante entre as SRB e os processos de biocorrosão ocorridos nas condutas de gás (Jan-Roblero *et al.*, 2004). Daí que a análise DGGE, utilizando *primers* universais de eubactérias, seja muitas vezes insuficiente para obter a diversidade microbiana de comunidades complexas.

A utilização da segunda estratégia (***nested-PCR-DGGE***) com *primers* PCR para grupos específicos de SRB possibilita que as SRB presentes em baixo número possam ser detectadas mais eficazmente, uma vez que se utilizam mais procedimentos de amplificação, incluindo uma amplificação com *primers* para grupos específicos de SRB. Desta forma o padrão DGGE obtido consistiu apenas em bandas de SRB.

Porém, tal como foi discutido nos capítulos 4.1.2.2 e 4.1.2.6, esta estratégia pode também implicar um maior grau de contaminação, quer devido aos produtos PCR de amplificações anteriores, quer devido à contaminação exógena pelo maior número de procedimentos de manipulação (Lo e Chan, 2006b), e ainda pela formação de um maior número de moléculas quiméricas durante o PCR, o que pode afectar a interpretação dos perfis de DGGE e conduzir a uma sobreavaliação de espécies microbianas (Eyers *et al.*, 2004).

Ainda assim, é possível concluir que a estratégia *nested-PCR-DGGE* constitui uma ferramenta útil para o estudo da diversidade de SRB em comunidades complexas contendo SRB em baixo número, sendo a especificidade dos *primers*, alvejando os diferentes grupos filogenéticos de SRB, de grande importância para o sucesso da estratégia.



### **Vantagens da análise DGGE:**

A análise DGGE apresenta inúmeras vantagens entre as quais:

- Fornecer um perfil imediato dos componentes de uma comunidade de uma forma qualitativa e semi-quantitativa, uma vez que a cada banda corresponderá uma espécie ou grupo presente na comunidade e que a intensidade relativa das bandas geradas traduz a abundância relativa dessa espécie na comunidade bacteriana analisada.
- Apesar da análise quantitativa ser incompleta (Capítulo 4.2.1.6), com a utilização da estratégia *nested*-PCR-DGGE, esta fraqueza é diluída, podendo chegar-se, de uma forma rápida, à abundância relativa dos membros de determinado grupo de interesse, sem a necessidade de recorrer a técnicas quantitativas como a FISH e a PCR em tempo real. Pode por exemplo, permitir uma avaliação rápida da dominância de determinado grupo de SRB envolvido no processo de biocorrosão industrial, recorrendo apenas a PCR.
- Os perfis de bandas resultantes da análise podem ser transferidos para membranas de hibridação e testados com sondas oligonucleotídicas (Capítulo 4.2.1.6) de forma a detectar-se a presença de determinada espécie ou grupo específico. Isto pode ser útil se houver informação de trabalhos anteriores sobre determinado grupo de SRB implicado em processos de biocorrosão.
- As bandas podem ser caracterizadas através da excisão, reamplificação e sequenciação directa dos fragmentos de DNA do gel, obtendo-se sequências para a análise filogenética e desenho de sondas, que podem ser úteis em futuros trabalhos.

### **Utilidade da análise DGGE:**

Ao nível da aplicabilidade e dos negócios que esta técnica pode propiciar, torna-se um método útil para comparar a composição de comunidades microbianas no tempo e no espaço de forma a facilitar a monitorização de determinados processos. Por exemplo, pode permitir monitorizar a resposta de uma comunidade microbiana a determinados estímulos externos de forma a melhor compreender e controlar os processos (Eyers *et al.*, 2004). No caso das SRB pode ser importante para melhor caracterizar e compreender o processo de biocorrosão mediado por SRB que ocorre em diversas instalações industriais ou para avaliar o efeito de estratégias de biorremediação de esgotos industriais recorrendo à utilização de SRB. Trata-se assim de uma abordagem reprodutível, rápida e eficiente para a análise das populações microbianas mistas de ambientes naturais e industriais.

## 5.2 Detecção e quantificação de SRB em esgotos industriais salinos de diversas indústrias químicas por *real-time* PCR (Ben-Dov *et al.*, 2007)

O PCR em tempo real é considerado um método altamente sensível para a quantificação de microrganismos em amostras ambientais.

Ben-Dov *et al.* (2007) efectuaram um estudo utilizando o PCR em tempo real com a detecção *SYBRGreen* para quantificar SRB em ambientes complexos de esgotos industriais produzidos por diversas indústrias químicas. A quantificação de SRB foi efectuada em lagoas de evaporação de esgotos industriais com elevada salinidade, tendo sido utilizados *primers* universais de PCR em tempo real para os genes de SRB: *dsrA* – redutase dissimilatória do sulfato e *apsA* – redutase adenosina-5'-fosfosulfato (APS redutase) (Ben-Dov *et al.*, 2007).

Os genes *dsrAB*, que codificam a enzima redutase dissimilatória do sulfato, podem ser usados como marcadores filogenéticos para a identificação de SRBs. Estes genes estão presentes em todas as SRB conhecidas e, desta forma, podem ser detectados por um único conjunto de *primers* conservados ou por *primers* específicos de uma região variável dos genes *dsrAB* (Wagner *et al.*, 1998).

Para além destes, as SRB possuem genes para a APS redutase – *apsBA* das bactérias e *aprBA* das arqueobactérias – que codificam sub-unidades de um heterodímero  $\alpha$ - $\beta$ , 1:1. Ambas as sub-unidades da enzima APS redutase são altamente conservadas e os genes da APS redutase foram propostos como marcadores filogenéticos úteis. A ausência de nucleotídeos ambíguos na sequência de todas as cadeias testadas indica que, provavelmente, somente uma cópia do gene *apsA* está presente em cada estirpe (Friedrich, 2002).

O objectivo do estudo de Ben-Dov *et al.* (2007) foi avaliar a abordagem de **PCR em tempo real** como um método rápido de quantificação de SRB em ambientes complexos de esgotos industriais (Ben-Dov *et al.*, 2007). Esta abordagem poderá ser aplicada a outras amostras complexas de origem industrial onde se espera que SRB estejam presentes.

### Esquema experimental

O estudo iniciou-se com a determinação do sulfureto e a quantificação de SRB, pelo método do número mais provável (MPN), das amostras recolhidas das cinco lagoas de evaporação de esgotos industriais (Figura 5.3). As lagoas são a fase final de tratamento de uma mistura complexa de esgotos salinos produzidos por diversas indústrias químicas do parque industrial *Ramat-Hovv*, no deserto *Negev*, Israel, fabricando vários pesticidas, fármacos, halogéneos alifáticos e aromáticos. Recebem uma mistura de esgotos industriais salinos, criando um habitat único para vários microrganismos.

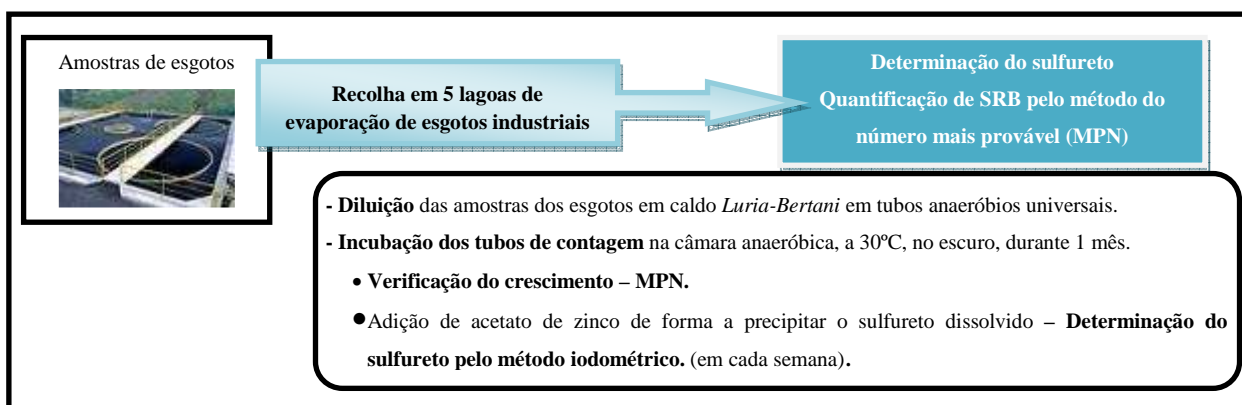
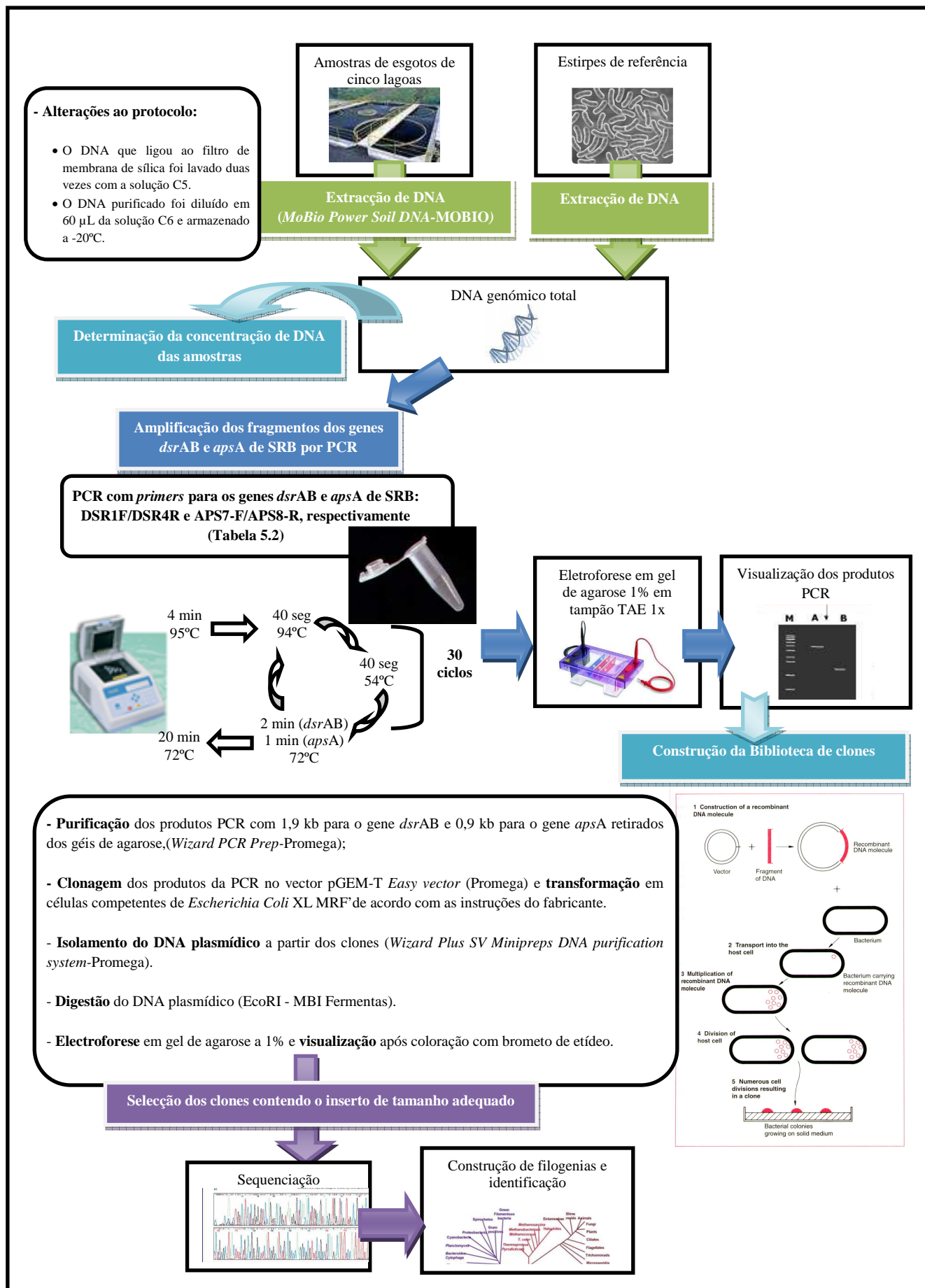


Figura 5.3 – Esquema experimental da determinação do sulfureto e da quantificação de SRB pelo MPN.

Posteriormente o estudo continuou com duas etapas:

Na **primeira etapa** (Figura 5.4) foi efectuada a amplificação por PCR dos fragmentos de aproximadamente 1,9 kb dos genes *dsrA* e *dsrB* e um fragmento de aproximadamente 0,9 kb do gene *apsA* a partir do DNA genómico total e a construção da biblioteca de clones contendo esses genes de forma a desenhar os primers para a quantificação por PCR em tempo real. Cada tubo de reacção PCR continha 12,5 µL *ReddyMix* (*PCR Master mix* contendo 1,5 mM de  $MgCl_2$  e 0,2 mM de concentração de cada um dos desoxirribonucleótidos; ABgene), 1 pmol de cada um dos *primers*, 1 a 2 µL da amostra preparada, mais água para completar o volume total de 25 µL. Foram usados os pares de *primers* DSR1F/DSR4R e APS7-F/APS8-R, para os genes *dsrAB* e *apsA* respectivamente, os quais estão representados na Tabela 5.2. Em cada reacção PCR utilizou-se um controlo positivo com a estirpe de referência identificadas na Tabela 5.2. Seguiu-se a construção de uma biblioteca de clones contendo estes genes e após a selecção dos clones contendo o inserto de tamanho adequado, estes foram sequenciados e procedeu-se à identificação e à construção de filogenias.



**Figura 5.4 – Esquema experimental da amplificação dos genes *dsrAB* e *apsA* de SRB de amostras ambientais e construção da biblioteca de clones.**

**Tabela 5.2 – Primers para PCR utilizados no estudo de Ben-Dov *et al.* (2007).**

Nome	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	Tamanho (bp)	Sequências alvo	Tamanho do produto de amplificação (bp)	Controlo positivo (+) e controlo negativo (-)	Referência
DSR1F	ACSCACTGGAAGCACG	gene <i>dsrAB</i> de SRB	16	450074 – 450089 <sup>(1)</sup>	≈1900	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM 644 (-) Sem amostra	Wagner <i>et al.</i> , 1998
DSR4R	GTGTAGCAGTTACCGCA		17	452000 – 452016			
APS7-F	GGGYCTKTCCGCYATCAAYAC	gene <i>apsA</i> de SRB	21	206 – 236 <sup>(2)</sup>	≈900	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM 644 (-) Sem amostra	Friedrich, 2002
APS8-R	GCACATGTCGAGGAAGTCTTC		21	1139 – 1159			

<sup>(1)</sup> Posição no genoma de *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *Vulgaris* (AE017285)

<sup>(2)</sup> Posição nos genes *apsA* (região: 933621 a 935615) de *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *Vulgaris* (AE017285)

Na **segunda etapa** foi efectuada a análise de PCR em tempo real e desenvolvimento das curvas padrão (Figura 5.5 A).

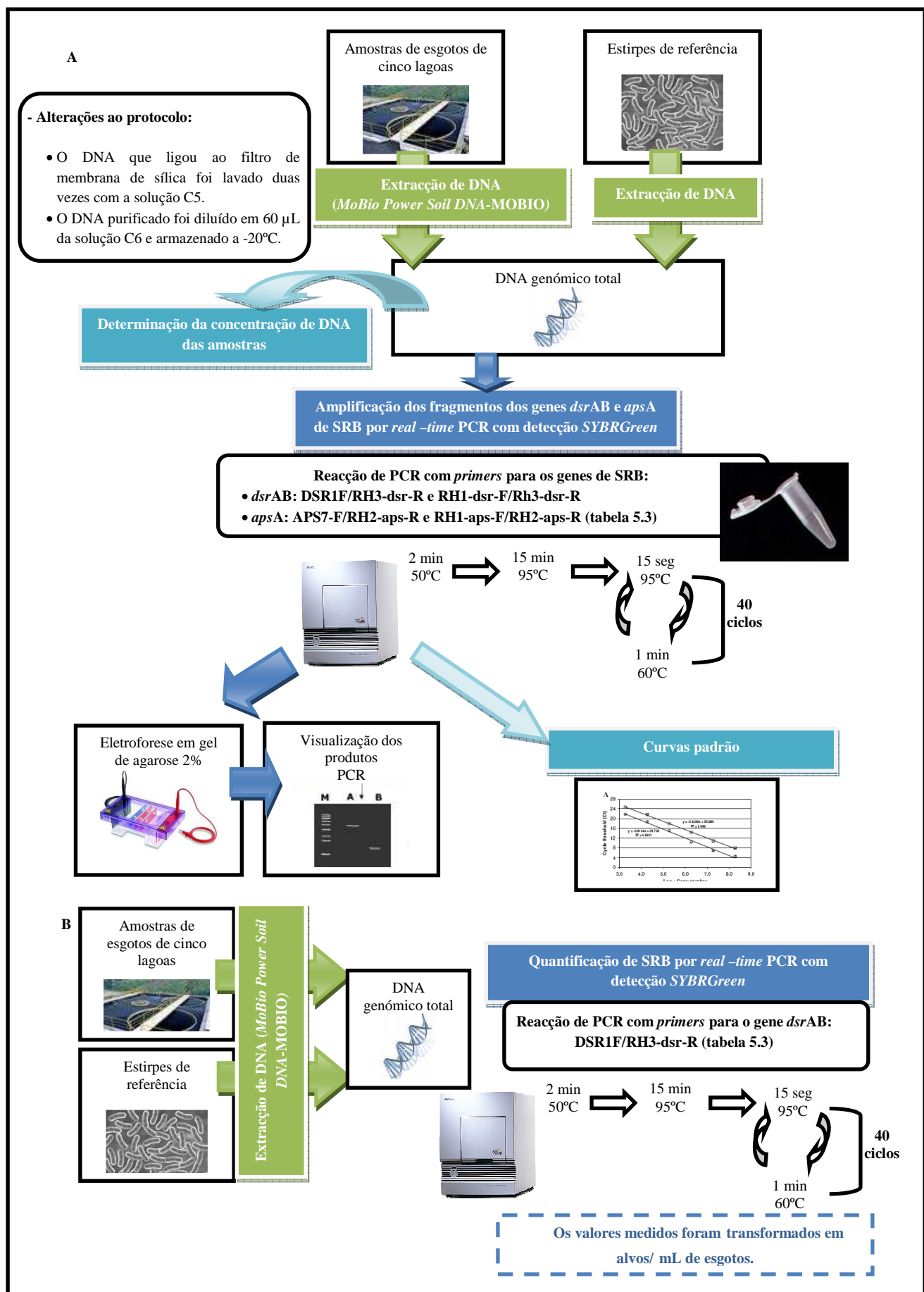
Os *primers* PCR usados foram desenhados a partir de alinhamentos múltiplos das sequências *dsrA* e *apsA* de SRBs locais (esgotos industriais) obtidas a partir das bibliotecas construídas e estão representados na Tabela 5.3.

A quantificação do DNA bacteriano foi executada num termociclador usando a seguinte mistura de reacção: 10µL de *Absolute QPCR SYBR ROX Mix*, 150 nM de cada um dos *primers* e 5,0µL de cada amostra de DNA, num total de 20µL. Para avaliar a sensibilidade e os limites de detecção dos *primers*, foi usado DNA extraído das culturas puras de *Desulfovibrio vulgaris* em cada ensaio do PCR em tempo real, como controlo positivo. Todas as corridas incluíram um controlo negativo sem amostra.

A detecção foi baseada na transferência energética por ressonância fluorescente com um fluoróforo *SYBRGreen*.

Posteriormente, foram desenvolvidas curvas padrão baseadas no DNA genómico de *Desulfovibrio vulgaris* da cultura pura e nos plasmídeos contendo os genes *dsrAB* e *apsA* de SRB. A linearidade e a reprodutibilidade das curvas padrão foram testadas usando os quatro pares de *primers*.

Finalmente foi efectuada a quantificação de SRB nas cinco lagoas de evaporação de esgotos industriais por PCR em tempo real, usando o corante *SYBRGreen I* (Figura 5.5 B). Nesta análise foi utilizada a curva padrão para os *primers* de *dsrA*, DSR1F e RH3-dsr-R (par de *primers* para o qual o número teórico de cópias do DNA genómico de *D. vulgaris* dez vezes diluído foi melhor estimado pelas curvas padrão). Os valores medidos foram transformados em alvos/ mL de esgotos.



**Figura 5.5 – Esquema experimental da análise *real-time* PCR e desenvolvimento de curvas padrão (A) e quantificação de SRB por *real-time* PCR com detecção SYBRGreen das amostras ambientais (B).**

Tabela 5.3 – Primers para real-time PCR utilizados no estudo de Ben-Dov *et al.* (2007).

Nome	Sequência (5' – 3')	Gene alvo	Tamanho (bp)	Sequências alvo <sup>(1)</sup>	Tamanho do produto de amplificação (bp)	Sequências usadas	Controlo positivo (+) e controlo negativo (-)	Referência
DSR1F	ACSCACTGGAAGCACG	<i>dsrAB</i>	16	187-202	222	gene <i>dsr</i> de <i>Archaeoglobus fulgidus</i> e <i>Desulfovibrio vulgaris</i> .	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM 644 (-) Sem amostra	Wagner <i>et al.</i> , 1998
RH3-dsr-R	gGTGGAGCCGTGCATGTT		18	391-408		gene <i>dsrA</i> de SRBs de esgotos industriais		Ben-Dov <i>et al.</i> , 2007
RH1-dsr-F	GCCGTTACTGTGACCAGCC		19	245-263	164	gene <i>dsrA</i> de SRBs de esgotos industriais	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM 644 (-) Sem amostra	Ben-Dov <i>et al.</i> , 2007
RH3-dsr-R	gGTGGAGCCGTGCATGTT		18	391-408				
APS7-F	GGGYCTKTCGCTATCAAYAC	<i>apsA</i>	21	206 - 236	279	genes <i>apsA/aprA</i> de <i>Desulfovibrio vulgaris</i> , <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> , <i>Allochromatium vinosum</i> (GenBank accession no. U84759), e <i>Archaeoglobus fulgidus</i> .	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM 644 (-) Sem amostra	Friedrich, 2002
RH2-aps-R	ATCATGATCTGCCAgCGgCCGGA		23	472-494		gene <i>apsA</i> de SRBs de esgotos industriais		Ben-Dov <i>et al.</i> , 2007
RH1-aps-F	CGCGAAGACCTKATCTTCGAC		21	304-324	191	gene <i>apsA</i> de SRBs de esgotos industriais	(+) <i>Desulfovibrio vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i> DSM 644 (-) Sem amostra	Ben-Dov <i>et al.</i> , 2007
RH2-aps-R	ATCATGATCTGCCAgCGgCCGGA		23	472-494				

<sup>(1)</sup> Posição nos genes *dsrA* (região: 449888 a 451201) ou *apsA* (região: 933621 a 935615) de *Desulfovibrio vulgaris* subsp. *Vulgaris* (AE017285)



## Resultados

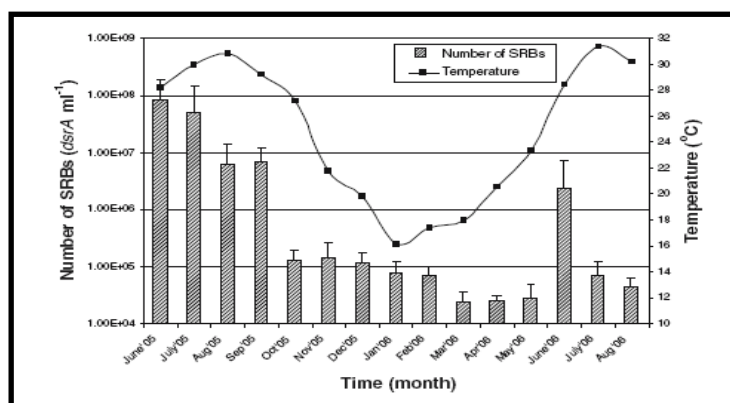
### Relações filogenéticas das sequências dos genes *dsrA* e *apsA*:

A análise filogenética das sequências representativas dos genes *dsrA* e *apsA*, retiradas de lagos de evaporação de esgotos industriais, provou que algumas mostraram uma maior homologia com *Desulfovibrio desulfuricans*, respectivamente, entre 97 e 99% e entre 95 e 99%.

### Quantificação de SRB em esgotos industriais por *real-time* PCR:

O nível de SRBs foi mais abundante durante o verão (Junho e Julho de 2005, aproximadamente  $10^8$  alvos/mL) e baixou durante Outubro de 2005 a Maio de 2006 (aproximadamente  $10^4$ - $10^5$  alvos/mL), voltando a aumentar os valores em Junho de 2006 (aproximadamente  $10^6$  alvos/mL). Desta forma foi demonstrada a influência da temperatura no número de SRB.

O nível inferior de SRB detectado durante o verão 2006, comparado com o verão de 2005, pode ser causado por diferenças no fluxo e menos compostos orgânicos nos esgotos durante 2006. Na figura 5.6 é possível observar esta variação.



**Figura 5.6 – Evolução sazonal de SRBs nos esgotos industriais altamente salinos. A abundância de SRB foi avaliada à profundidade de 6 metros de cinco lagoas de evaporação de esgotos industriais e comparada com a temperatura a essa profundidade. O comprimento da barra representa a média do número de SRBs das amostras das cinco lagoas e as barras fininhas representam o desvio padrão. (Ben-Dov *et al.*, 2007).**

A comparação da quantificação do número de células de SRB por PCR em tempo real e pelo método do número mais provável (MPN), baseado na detecção do sulfureto, revelou que a primeira técnica ( $2,69 \times 10^6$  alvos/mL) foi aproximadamente 100x mais elevada do que a última (aproximadamente  $10^4$  alvos/mL).

## Discussão

### Real-time PCR

Como referido no capítulo 4.2.2 o *real-time PCR* é uma técnica usada para amplificar e simultaneamente quantificar uma molécula alvo de DNA, permitindo desta forma a detecção e a quantificação de uma sequência específica numa amostra de DNA (Mackay, 2007).

A abordagem *real-time PCR* com detecção *SYBRGreen*, usando *primers* para os genes *dsrAB* e *apsA*, demonstrou ser útil na detecção de SRB não cultiváveis e na sua quantificação em amostras ambientais, como os esgotos industriais altamente salinos. Os *primers* PCR para *dsrA* e *apsA*, desenvolvidos neste artigo detectam e quantificam especificamente SRB, uma vez que a análise *real-time PCR* com estes *primers* não levou à formação de produtos inespecíficos secundários. O problema da utilização destes *primers* gerais para os genes *dsrAB* e *apsA* é a impossibilidade de quantificar discriminando subgrupos de SRB. Neste estudo, a identificação das espécies de SRB presentes foi possível através da sequenciação de fragmentos amplificados por PCR a partir das amostras. Uma alternativa poderia ser utilizar *primers* para grupos específicos de SRB, como por exemplo *primers* específicos para o gene rDNA 16S. Porém, a utilização de *primers* específicos para o rDNA 16S na quantificação *real-time PCR* não permite que os resultados sejam directamente correlacionados com o número de células porque as operações do gene do rRNA 16S não são iguais em todas as bactérias (Tourova, 2003). Além disso, a heterogeneidade encontrada nas regiões conservadas dos genes do rRNA 16S e o facto de algumas estirpes de SRB incluírem sequências heterogéneas, que podem variar entre duas a quatro tipos por estirpe (Smits *et al.*, 2004), limita a utilidade de usar *primers* para rDNA 16S na monitorização da comunidade total de SRB. Acrescente-se que, a quantificação *real-time PCR* de alguns géneros de SRB com *primers* para o gene do rRNA 16S pode ser sobreestimada mais de 100 vezes (Smits *et al.*, 2004). Com os *primers* específicos para genes funcionais (*dsrAB* e *apsA*), podem ser sobreestimados desde 0,7 até 80 vezes, dependendo da curva padrão e conjunto de *primers* usados e do valor do número inicial de cópias (Ben-Dov *et al.*, 2007). Uma outra possibilidade para permitir a quantificação dos subgrupos de SRB presentes nas amostras seria a utilização da tecnologia FISH com sondas para grupos específicos de SRB.

Uma outra limitação da aplicação desta técnica é o facto de implicar um estudo prévio com a construção de bibliotecas de clones para o desenho de *primers* e o desenvolvimento de curvas padrão. Isto pode fazer com que a técnica se torne pouco viável comparativamente com os resultados que fornece.

No entanto pode concluir-se que a técnica fornece meios altamente sensíveis de identificação e quantificação das SRB e facilita muito a análise bacteriana de amostras ambientais.

### **Variações do *real-time* PCR**

A técnica *real-time* PCR pode ser combinada com a transcrição reversa do RNA (RT-PCR) para determinar a baixa quantidade de RNA mensageiro (mRNA), permitindo quantificar a expressão génica relativa num determinado momento ou em certos tipos de tecidos ou células (Qin, 2006 e Mackay, 2007). Por exemplo, recentemente, foi desenvolvido um método de RT-PCR (com detecção do cDNA pela sonda TaqMan) para a quantificação do mRNA da redutase dissimilatória do bissulfito em *Desulfobacterium autotrophicum*, como indicador metabólico de SRBs. O método tem também o potencial de ser aplicado em ambientes naturais (Neretin *et al.*, 2003). Este pode ser um método mais importante para distinguir a atividade de SRBs, mas menos para a quantificação da população bacteriana.

Outra variação, o PCR competitivo (cPCR), foi recentemente desenvolvida baseada na amplificação dos genes *dsrAB* (Leloup *et al.*, 2004). Baseia-se na co-amplificação de uma sequência alvo e de uma sequência interna padrão conhecida como competidora. Este método não exige uma sequência interna conservada, mas é mais demorado do que o método apresentado no artigo de Ben-Dov *et al.* (2007). A vantagem principal desta técnica é que os contaminantes co-extraídos com os ácidos nucleicos têm efeitos similares na amplificação do alvo e da sequência competidora. As desvantagens da técnica incluem o aumento das repetições exigidas para finalidades de verificação e uma estimativa semiquantitativa baseada na electroforese em gel. Usando o PCR competitivo dos genes *dsrAB*, Leloup *et al.*, verificaram a abundância de SRB num estuário. Demonstraram, tal como neste estudo de Ben-Dov *et al.* (2007), que as SRB exibem uma dinâmica sazonal com abundância e atividade mais elevadas durante o início do verão, parecendo ser principalmente controlados por parâmetros físicos-químicos (temperatura e concentração

do carbono orgânico dissolvido) e evolução topográfica do estuário (erosão/depósito de erosão) (Leloup *et al.*, 2004).

### **Utilidade do *real-time* PCR**

A abordagem *real-time* PCR, utilizando estes *primers* pode potenciar várias aplicações e constituir algumas oportunidades de negócio para os laboratórios que a utilizam, permitindo monitorizar processos de biorremediação de esgotos industriais contendo sulfato e, ao mesmo tempo, controlar a biocorrosão das instalações de tratamento de águas residuais.

Os esgotos industriais contêm grande diversidade microbiana, como está definido pelas bibliotecas de rDNA 16S (Dar *et al.*, 2005). Um dos grupos bacterianos presentes e com importante participação na biorremediação destes esgotos são as SRB, que realizam a respiração anaeróbia do sulfato. No entanto, deste processo resulta a produção de H<sub>2</sub>S, um composto tóxico, que pode aumentar significativamente a corrosão microbiana nos sistemas de tratamento de esgotos. Para tentar encontrar um equilíbrio entre estas duas situações antagónicas é possível utilizar a abordagem *real-time* PCR. Os genes *dsrAB* e *apsA* podem ser usados como marcadores filogenéticos para análises das comunidades microbianas, por *real-time* PCR, de forma a proceder a comparações do número de SRB ao longo do tempo e em diferentes condições, com o objectivo de avaliar o potencial da produção de H<sub>2</sub>S através da respiração anaeróbia do sulfato pelas SRB. Com este método, pode ser possível melhorar a monitorização do processo de biorremediação de esgotos industriais, sabendo qual o limite de SRB que devem estar presentes para que a produção de sulfureto durante a respiração anaeróbia das SRB não se torne uma ameaça para a corrosão das tubagens.

### **5.3 Estudo da dominância relativa de SRB seleccionadas, num biorreactor contínuo, por FISH (Icgen *et al.*, 2006)**

Icgen *et al.* (2006) investigaram, recorrendo à tecnologia FISH, a diversidade e a estrutura da comunidade de SRBs num biorreactor anaeróbio contínuo, contendo uma comunidade microbiana complexa usada no tratamento de esgotos ricos em sulfato. Foram usadas sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S (Icgen *et al.*, 2006).

A redução anaeróbia do sulfato pelas SRB tem potencial para a biorremediação de efluentes industriais contendo sulfato e metais pesados. O conhecimento do género ou grupo microbiano dominante no processo de redução do sulfato, sob condições específicas pode ser útil para o desenho e aplicação de métodos de biorremediação eficazes.

No trabalho de Icgen *et al.* (2006), a técnica **FISH** foi usada para caracterizar grupos de microrganismos pré-definidos, representados pelas sondas seleccionadas, em amostras retiradas do biorreactor contínuo, operado no estado estável. A comunidade de SRBs foi caracterizada, usando cinco sondas para géneros específicos e quatro sondas para grupos específicos. O método foi desenvolvido para permitir estudos quantitativos de populações microbianas de modo a facilitar a identificação dos deslocamentos na população microbiana em função das condições do processo, permitindo assim melhorar a eficácia do método de remediação utilizado (Icgen *et al.*, 2006).

### **Esquema experimental**

As amostras retiradas do biorreactor contínuo, operado no estado estacionário foram caracterizadas através da análise FISH, tal como representado no esquema da Figura 5.7.

De uma base de dados (*ProbeBase*) foram seleccionadas sequências para sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S. Todas as sondas foram sintetizadas comercialmente e marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FICT) na terminação 5'.

Para cada sonda marcada foi determinada a concentração de formamida para a qual a sonda hibrida especificamente. Para tal, foram feitas hibridações usando os organismos alvos e não alvo com diferentes concentrações de formamida (0 a 60% (v/v)).

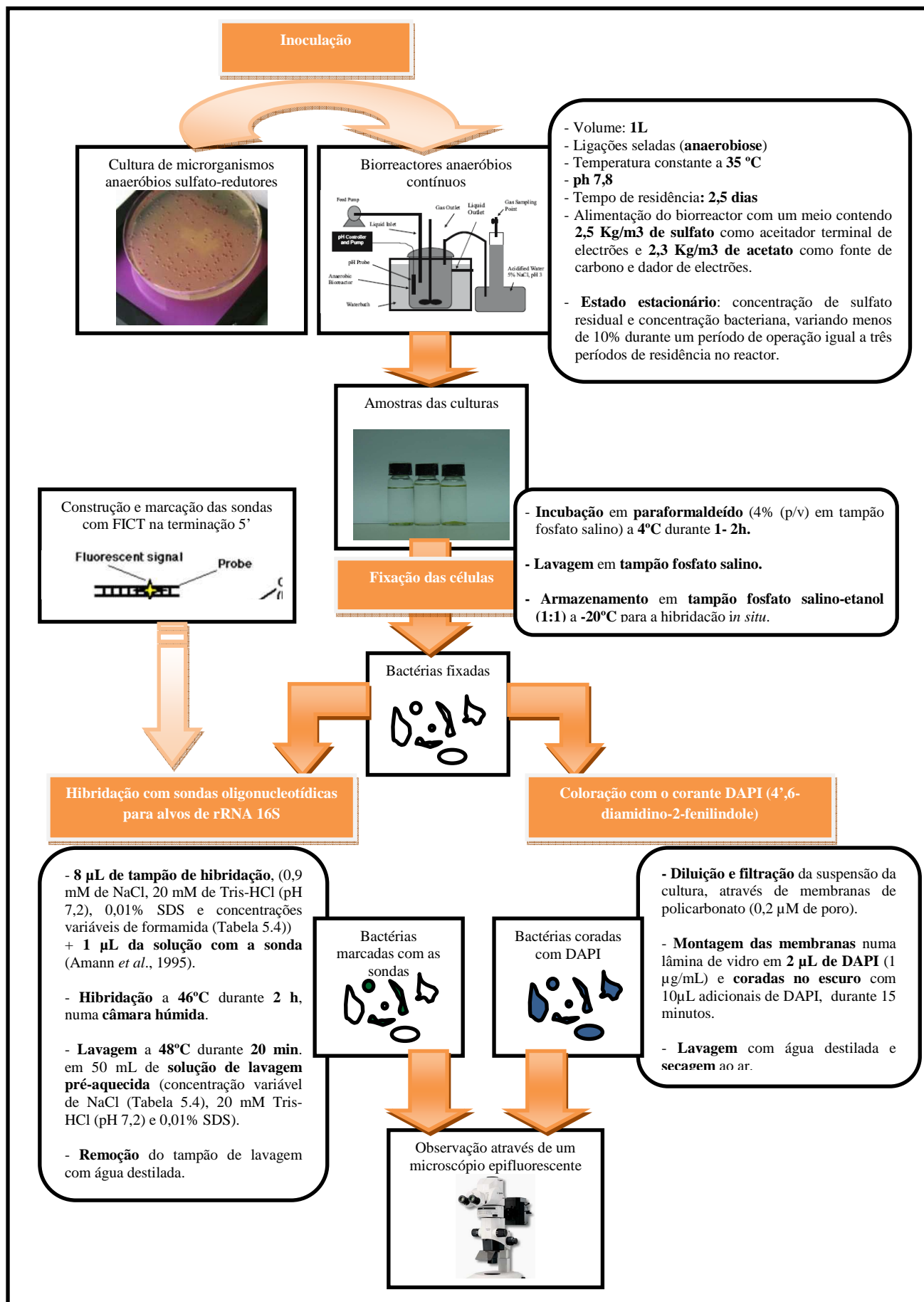
As sondas utilizadas, bem como as condições de especificidade, estão representadas na Tabela 5.4.

A população procariótica total foi determinada com o corante DAPI.

O número total de célula hibridadas foi estimado por contagem das células que hibridaram com a sonda EUB338, isto é, bactérias. Os resultados das contagens foram corrigidos por subtracção dos sinais observados com a sonda NON338.

As observações microscópicas e a aquisição de imagens foram realizadas com microscópio epifluorescente utilizando filtros adequados para cada corante. A contagem das células foi feita directamente, calculando a média do número de células obtidas num mínimo de 10 campos microscópicos aleatoriamente escolhidos.

A intensidade mais elevada de fluorescência de cada substrato foi determinada e este valor foi utilizado como valor inicial mais baixo. Todos os pixeis com intensidade de fluorescência acima do valor inicial foram contados como área marcada com sondas. Os resultados são mostrados como uma proporção de células dentro de um grupo (domínio, género ou espécie), ou seja, hibridadas com a sonda representativa desse grupo relativamente ao total de células coradas com DAPI (Icgen *et al.*, 2006).



**Figura 5.7 – Esquema experimental da análise FISH da diversidade e da estrutura da comunidade de SRBs num biorreactor anaeróbio contínuo.**

Tabela 5.4 – Sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S usadas no estudo de Içgen *et al.*, 2006.

Sonda		Sequência da sonda (5' – 3')	Tamanho (bp)	Sequência alvo <sup>(1)</sup>	Especificidade	Controlo positivo (culturas puras) <sup>(2)</sup>	Controlo negativo	Concentração de formamida (%) no tampão de hibridação	Concentração de cloreto de sódio (mM) no tampão de lavagem	Referência
Gerais	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18	338-355	Maioria das bactérias	SRBs, <i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	Sem amostra	10	0,386	Amann <i>et al.</i> , 1990
	NON338	ACTCCTACGGGAGGCAGC	18	338-355	Nenhuma	-	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	0	0,9	Manz <i>et al.</i> , 1992
Grupos específicos	SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGC	18	385-402	Algumas SRBs	SRBs	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	30	0,071	Amann <i>et al.</i> , 1992
	SRB687	TACGGATTTCACTCCT	16	687-702	<i>Desulfovibrionaceae</i>	<i>Desulfovibrio gigas</i> DSM 496	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	10	0,386	Devereux <i>et al.</i> , 1992
	SRB814	ACCTAGTGATCAACGTTT	18	814-831	Grupo <i>Desulfococcus</i> ( <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfobotulus</i> )	<i>Desulfococcus multivorans</i> DSM 2059	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	10	0,386	Devereux <i>et al.</i> , 1992
	SRB804	CAACGTTTACTGCGTGGA	18	804-821	<i>Desulfobacteriaceae</i>	<i>Desulfobacter latus</i> DSM 3381	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	10	0,386	Devereux <i>et al.</i> , 1992
Gêneros específicos	SRB129	CAGGCTTGAAGGCAGATT	18	129-146	<i>Desulfobacter</i>	<i>Desulfobacter latus</i> DSM 3381	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	10	0,386	Devereux <i>et al.</i> , 1992
	SRB221	TGCGCGGACTCATCTTCAAA	20	221-240	<i>Desulfobacterium</i>	<i>Desulfobacterium autotrophicum</i> DSM 3382	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	10	0,386	Devereux <i>et al.</i> , 1992
	SRB228	GGGACGCGGAYCCAT	15	228-242	<i>Desulfotomaculum</i> spp.	<i>Desulfotomaculum ruminis</i> DSM 2154	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	50	0,019	Daly <i>et al.</i> , 2000
	SRB660	GAATTCCTCTTCCCCTCTG	20	660-679	<i>Desulfobulbus</i>	<i>Desulfobulbus propionicus</i> DSM 2056	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	30	0,071	Devereux <i>et al.</i> , 1992
	SRB657	TTCCGCTTCCCTCTCCATA	20	657-676	<i>Desulfonema</i> spp.	<i>Desulfonema limicola</i> DSM 2076	<i>Escherichia coli</i> NCTC 09001	30	0,071	Fukui <i>et al.</i> , 1999

<sup>(1)</sup> Posição no rRNA 16S de acordo com a numeração em *E. coli*.

<sup>(2)</sup> Culturas puras obtidas no *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* (Alemanha).



## Resultados

A análise da hibridação, usando as sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S anteriormente referidas, permitiu estudar a diversidade e a estrutura da comunidade de SRBs num biorreator anaeróbio contínuo, contendo uma comunidade microbiana complexa usada no tratamento de esgotos ricos em sulfato. Esta análise mostrou que, dos grupos microbianos investigados, as principais SRB presentes no biorreator anaeróbio eram dos géneros *Desulfonema* spp. (74%), *Desulfobulbus* spp. (52%) e do grupo *Desulfobacteriaceae* (55%). Por outro lado, as *Desulfovibrionaceae* (19%) e o género *Desulfobacter* (26%) representam uma pequena parte da população no biorreator.

A abundância relativa de SRBs e dos seus géneros no biorreator anaeróbio está representada na Figura 5.8 e na Tabela 5.5.

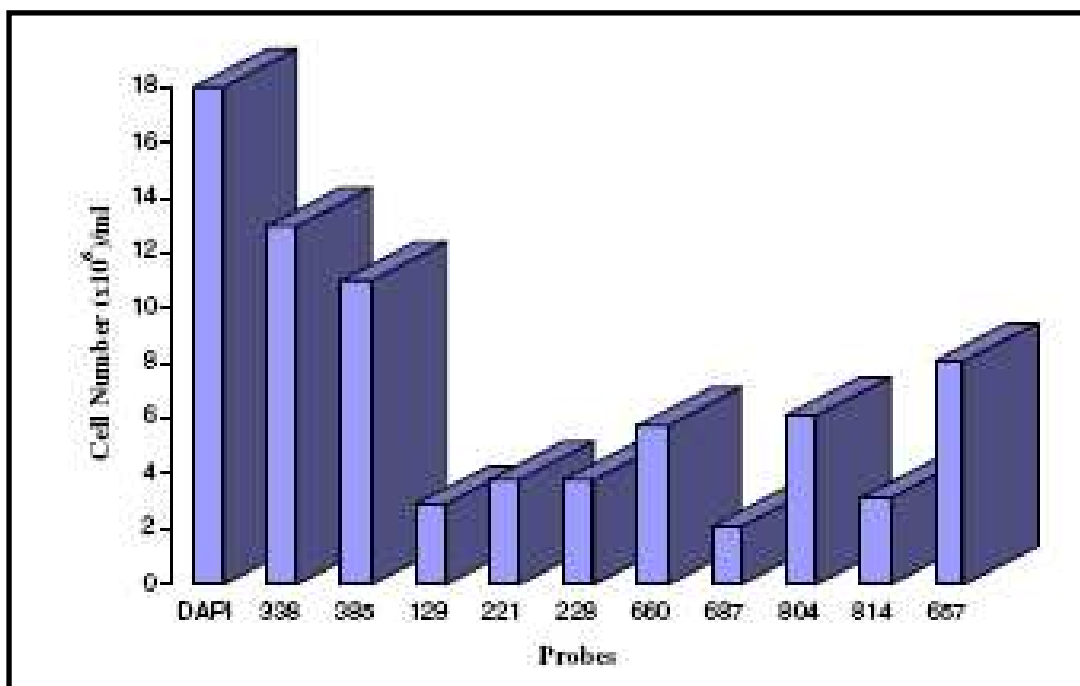


Figura 5.8 – Abundância da população de SRB no biorreator anaeróbio (Icgen *et al.*, 2006).

Tabela 5.5 – Abundância da população de SRB no biorreactor anaeróbio (Icgen *et al.*, 2006).

Sondas		Especificidade	Número de células ( $\times 10^7$ )/mL	Percentagem de células coradas com DAPI	Percentagem de células reconhecidas com a sonda EUB338	Percentagem de células reconhecidas com a sonda SRB385
Gerais	DAPI	Células procarióticas	1,8	-	-	-
	EUB338	Maioria das bactérias	1,3	72%	-	-
Grupos específicos	SRB385	Algumas SRB	1,1	61%	85%	-
	SRB804	<i>Desulfobacteriaceae</i>	0,61	34%	47%	55%
	SRB814	Grupo <i>Desulfococcus</i> ( <i>Desulfococcus</i> , <i>Desulfosarcina</i> , <i>Desulfobotulus</i> )	0,31	17%	24%	28%
	SRB687	<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,208	12%	16%	19%
Géneros específicos	SRB657	<i>Desulfonema</i> spp.	0,81	45%	62%	74%
	SRB660	<i>Desulfobulbus</i>	0,57	32%	44%	52%
	SRB221	<i>Desulfobacterium</i>	0,377	21%	29%	34%
	SRB228	<i>Desulfotomaculum</i> spp.	0,377	21%	29%	34%
	SRB129	<i>Desulfobacter</i>	0,286	16%	22%	26%

## **Discussão**

### **FISH – Hibridação *in situ* por fluorescência**

A aplicação de métodos directos *in situ*, para identificar microrganismos, como o FISH, permite que comunidades microbianas complexas sejam caracterizadas no seu habitat natural. A técnica FISH, não só possibilita a identificação e enumeração ao nível de uma única célula, mas pode ainda revelar o arranjo espacial dos microrganismos no seu ambiente natural (Lücker *et al.*, 2007). É ainda possível utilizar programas sofisticados que permitem a quantificação e reconstrução semiautomáticas de objectos tridimensionais a partir das imagens FISH (Pernthaler *et al.*, 2003).

Particularmente, a hibridação *in situ* usando sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA, fornece uma avaliação relativa à actividade microbiana, uma vez que as condições ambientais influenciam o conteúdo celular de rRNA, sendo a quantidade de rRNA correlacionada com a taxa de crescimento (Icgen *et al.*, 2006). Dada a importância das SRB na ecologia microbiana, diversas sondas oligonucleotídicas para alvos de rRNA 16S foram desenhadas para detectar grupos de SRB (Amann *et al.*, 1992, Devereux *et al.*, 1992 e Daly *et al.*, 2000) e utilizadas com sucesso para demonstrar a sua presença em vários habitats, como biofilmes anaeróbios (Amann *et al.*, 1992 e Kjellerup *et al.*, 2005), sedimentos de água doce (Kenzaka *et al.*, 1998), lagos salgados (Rooney-Varga *et al.*, 1997), lamas activadas (Wagner *et al.*, 1993) e locais de descarga de esgotos industriais (Daly *et al.*, 2000).

### **FISH – Problemas e vantagens da hibridação *in situ* por fluorescência**

A técnica FISH, embora promissora, apresenta algumas limitações.

- Uma das principais limitações é que nem todos os tipos de SRB podem ser inequivocamente identificados em amostras ambientais ou industriais com sondas para alvos de rRNA previamente descritas, tal como referido no capítulo 4.3.1. A completa exploração de técnicas baseadas no FISH para a análise da estrutura e função das comunidades de SRB é dificultada pela disponibilidade incompleta de sondas FISH para alvos de rRNA 16S. Além disso, as reconhecidas especificidade e cobertura das sondas existentes, podem mudar com o aumento rápido do número de sequências de 16S rRNA que são depositadas em bases de dados públicas, sendo que a aplicação das sondas e posteriores conclusões deve ser feita com

conhecimento das limitações da técnica. Desta forma são necessárias reavaliações regulares (Lücker *et al.*, 2007). O desenvolvimento de sondas específicas para todos os grupos filogenéticos de SRB facilitaria a compreensão do papel de cada um destes grupos no ambiente (Castro *et al.*, 2000).

- Para além disso, a heterogeneidade do rRNA 16S entre múltiplas cópias dentro da mesma espécie – diversidade intragenómica – pode causar problemas em interpretações relativas à diversidade e abundância (Dahllöf, 2002 e Janda *et al.*, 2007). Este gene também carece de resolução ao nível da espécie. Algumas espécies dentro de um género ou mesmo de géneros diferentes podem ter sequências idênticas do gene rDNA 16S, o que torna difícil a diferenciação e classificação baseada unicamente na sua sequenciação (Han, 2006). A sequenciação deste gene tem baixo poder filogenético ao nível da espécie e da subespécie e pobre poder discriminatório para alguns géneros, sendo necessários estudos complementares de hibridação de DNA para fornecer resolução absoluta para estes problemas taxonómicos (Janda *et al.*, 2007). Ao nível das subespécies são mais comuns as sequências idênticas do rDNA 16S. Concluindo, as SRB constituem um grupo heterogéneo, incluindo membros de vários filos e domínios. Assim, não é praticável usar o gene rDNA 16S como marcador molecular geral. Uma alternativa pode ser a utilização de genes funcionais, como os genes que codificam enzimas que intervêm na redução do sulfato – *dsrA* e *apsA* – que podem funcionar como marcadores filogenéticos úteis (Ben-Dov *et al.*, 2007).
- Uma outra limitação da utilização desta tecnologia tem a ver com a sua aplicação *in situ*. Um problema comum nos procedimentos de hibridação *in situ* é a o elevado *background* como a autofluorescência dos substratos (Tate e Ostroff, 2002), também referido no capítulo 4.3.1. Por exemplo, sondas fluorescentes de rRNA são difíceis de usar nos sedimentos ou nos esgotos industriais dada a elevada autofluorescência das partículas minerais (Ben-Dov *et al.*, 2007). Um outro problema é a coloração não específica que pode ser devida à ligação não específica da sonda ou à ligação não específica do anticorpo usado para visualizar a sonda (Tate e Ostroff, 2002).
- A especificidade das sondas pode igualmente constituir um problema. A construção de sondas de tamanho adequado é fundamental para se conseguir a especificidade adequada de forma a hibridar com os alvos (Tate e Ostroff, 2002). A maioria dos

problemas quanto à especificidade do FISH relaciona-se com a hibridação das sondas e a posterior detecção. Pode ser necessária a optimização das condições de hibridação *in situ*. A restringência (medida arbitrária da especificidade) da hibridação e das lavagens pós-hibridação devem ser ajustadas para cada sonda marcada, executando hibridações de células intactas, usando organismos-alvo e não alvo. Esta pode ser regida pelas concentrações de formamida e cloreto de sódio e pela temperatura. Aumentando a temperatura e a concentração de formamida (aumenta a restringência), diminui-se a hibridação e a diminuição da concentração de cloreto de sódio tem o mesmo efeito. Estes três factores têm o efeito de destabilizar as ligações de hidrogénio necessárias para a ligação das sondas ao alvo. O objectivo é determinar a restringência óptima (concentração de formamida) para a qual a sonda hibrida especificamente com os organismos alvo, mas não com os não alvo (Bartlett, 2004). No estudo de Icen *et al.* (2006) a restringência óptima de cada sonda foi determinada executando hibridações usando organismos alvo e não alvo com diferentes concentrações de formamida (0 a 60% (v/v)) (Icen *et al.*, 2006).

Porém, apesar dos inconvenientes, também existem inúmeras vantagens no FISH.

- Uma das vantagens do FISH é que para além de ser uma técnica independente do cultivo, é ainda independente da extracção de ácidos nucleicos (Icen *et al.*, 2006).
- O FISH utiliza marcadores fluorescentes sendo uma vantajosa alternativa à utilização de sondas com marcação radioactiva. O FISH apresenta resolução, velocidade e segurança mais elevadas (Levsky *et al.*, 2003).
- Esta técnica permite ainda a detecção simultânea de múltiplos alvos, por exemplo, através da utilização de fluoróforos de cores diferentes, possibilitando uma análise *multiplex*. (Gutiérrez *et al.*, 2003) Com o FISH é possível a análise quantitativa, recorrendo ao auxílio de programas informáticos que, inclusivamente, permitem a correcção da autofluorescência dos substratos, e também a visualização de células vivas (Levsky *et al.*, 2003).
- Avanços na microscopia e nos métodos de detecção permitirão um aumento de sensibilidade da tecnologia FISH (Levsky *et al.*, 2003).

Concluindo, para fornecer a descrição completa da diversidade populacional e da estrutura da comunidade é necessário combinar a metodologia FISH com métodos baseados no PCR, como a construção de bibliotecas de genes de rRNA 16S, o DGGE e *fingerprinting* por restrição enzimática com endonucleases. Estes métodos baseados no PCR permitem identificar espécies adicionais para as quais não foram seleccionadas sondas. A análise FISH complementa estes métodos fornecendo a dominância relativa de cada grupo (Icgen *et al.*, 2006).

### **Utilidade do FISH:**

O FISH, ao caracterizar comunidades microbianas complexas, permitindo não só a identificação das espécies presentes, como também a sua enumeração, pode permitir otimizar determinados processos.

Por exemplo, a redução anaeróbia do sulfato pelas SRB tem potencial para o tratamento de efluentes industriais contendo sulfato e metais pesados, uma vez que as SRB facilitam indirectamente a remoção de metais tóxicos pela sua precipitação, com H<sub>2</sub>S gerado pela redução do sulfato, em sulfuretos insolúveis. Desta forma, ocorre a remoção simultânea de sulfato e de metais pesados, o que apresenta grande relevância e aplicabilidade para a remediação de efluentes de uma grande variedade de processos industriais e também de esgotos de minas ácidas.

Neste caso, o conhecimento da estrutura das comunidades microbianas, nomeadamente no que diz respeito à proporção de SRB, através da técnica FISH, em função das condições de operação do bioprocessamento permite otimizar o processo de tratamento de esgotos industriais e de águas de drenagem de minas ácidas. Isto é particularmente importante devido à variabilidade na composição dos efluentes, potenciando uma rápida mudança nas condições do processo. Desta forma, a detecção e a potencial manipulação da diversidade microbiana neste processo de tratamento é crucial para a sua eficácia (Icgen *et al.*, 2006).

#### 5.4 Análise comparativa dos tempos de resposta dos métodos moleculares

Com o objectivo de comparar os métodos moleculares utilizados nos três estudos analisados nos pontos 5.1, 5.2 e 5.3 foi efectuado um levantamento das principais etapas implicadas em cada uma das abordagens, tendo sido calculado um tempo mínimo de resposta para cada abordagem. Para o cálculo deste tempo de resposta consideraram-se apenas as etapas essenciais, podendo ser acrescentadas outras etapas de acordo com o estudo a desenvolver. Para tal recorreu-se à consulta de alguns protocolos, incluindo os dos três estudos anteriormente analisados.

Na Tabela 5.6 encontram-se representados o equipamento base requerido, as etapas e os tempos de resposta dos três métodos moleculares analisados, bem como as suas aplicações e limitações.

Analisando a tabela é possível constatar que a abordagem *nested*-PCR-DGGE, utilizando *primers* universais e *primers* para grupos específicos de SRB, permite obter uma resposta em cerca de dois dias. Apesar da metodologia DGGE ser algo demorada, cerca de 18 horas, esta permite o processamento de diversas amostras simultaneamente, possibilitando deste modo uma análise comparativa rápida. Em termos práticos pode ajudar a encontrar a origem de contaminação associada a um problema de biocorrosão, uma vez que possibilita a comparação, no tempo e no espaço, de determinados ambientes relativamente à composição bacteriana, permitindo investigar qual ou quais bactérias causaram o problema. Por outro lado, e uma vez que possibilita a monitorização das variações numa comunidade bacteriana, pode ser útil na optimização de processos de biorremediação de esgotos industriais, permitindo perceber quais as bactérias que melhor contribuem para esse processo. Esta abordagem tem como principal inconveniente ser uma análise semi-quantitativa, permitindo apenas obter uma abundância relativa de determinado grupo.

Relativamente às outras duas abordagens, *real-time* PCR e FISH, estas já permitem, para além da detecção, a quantificação de grupos ou géneros bacterianos. Em termos práticos podem também ajudar na monitorização das condições de um dado processo de biorremediação de esgotos industriais utilizando SRB de forma a optimizar o método de biorremediação utilizado. Simultaneamente, uma vez que se tratam de métodos quantitativos, podem permitir controlar a ocorrência de corrosão nas instalações industriais

causada pelas SRB, sabendo qual o limite de SRB que devem estar presentes para que a produção de sulfureto durante a respiração anaeróbia das SRB não se torne uma ameaça para a corrosão das tubagens.

Comparando as duas abordagens relativamente aos tempos de resposta, a metodologia *real-time* PCR, tem como principal inconveniente o facto de ser muito trabalhosa e requerer um estudo prévio da população para o desenho de *primers* adequados e ainda o desenvolvimento de curvas padrão para otimizar a abordagem. Por sua vez e dado que para este estudo são necessários vários procedimentos laboratoriais, incluindo PCRs, electroforeses, clonagem e sequenciação, esta metodologia torna-se necessariamente mais dispendiosa.

A metodologia FISH possibilita uma análise comparativa recorrendo à automatização. Como principal inconveniente, refere-se a dependência relativamente à informação que consta das bases de dados para a construção das sondas não permitindo identificar espécies adicionais para as quais não foram seleccionadas sondas. Além disso, a análise dos resultados pode ser dificultada devido ao elevada autofluorescência de alguns substratos.



Tabela 5.6 – Comparação de três métodos moleculares no que diz respeito ao equipamento base requerido, etapas, tempos de resposta, aplicações e inconvenientes.

Método Molecular	Equipamento base	Passos necessários para efectuar análises		Tempos (minutos)	Tempo mínimo de resposta	Referências	Observações
<i>nested</i> -PCR-DGGE	Termociclador Aparelho para DGGE	Extracção de DNA genómico	Extracção DNA da amostra	≈ 30 minutos	≈ 1890 minutos ≈ 31,5 horas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dar <i>et al.</i>, 2005</li> <li>• MoBio Laboratories, 2008a</li> <li>• Vossen, 2001</li> </ul>	<p><b>Aplicações:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecção</li> <li>- Monitorização das variações na comunidade / população</li> <li>- Análise comparativa rápida</li> <li>- Abundância relativa de determinado grupo quando comparada com a análise PCR-DGGE (1 etapa) com <i>primers</i> universais DGGE</li> </ul> <p><b>Limitações:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Inconvenientes associados à PCR</li> <li>- A identificação requer sequenciação das bandas obtidas por DGGE</li> <li>- Análise semi-quantitativa</li> </ul>
			Extracção DNA das estirpes de referência (n controlos positivos)	≈ n x30 minutos			
			Electroforese em gel de agarose (preparação + electroforese + coloração + visualização)	≈ 90 minutos			
		<i>nested</i> -PCR-DGGE	PCR com <i>primers</i> universais	≈ 120 minutos			
			PCR com <i>primers</i> para grupos específicos de SRB (n pares de <i>primers</i> )	≈ n x120 minutos			
			PCR com <i>primers</i> universais DGGE	≈ 120 minutos			
Real-time PCR	Termociclador <i>Real Time PCR detection system</i>	Extracção de DNA genómico	DGGE (preparação + electroforese + coloração + visualização)	≈ 18 horas ≈ 1080 minutos	≈ 390 minutos ≈ 6,5 horas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ben-Dov <i>et al.</i>, 2007</li> <li>• MoBio Laboratories, 2008b</li> </ul>	<p><b>Aplicações:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecção e quantificação</li> </ul> <p><b>Limitações:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Trabalhoso</li> <li>- Requer estudo prévio complexo com construção de biblioteca de clones para o desenho de <i>primers</i> e desenvolvimento de curvas padrão que implicam diversas reacções PCR e electroforeses e ainda procedimentos de clonagem e sequenciação.</li> </ul>
			Extracção DNA da amostra	≈ 30 minutos			
			Extracção DNA da estirpe de referência (controlo positivo)	≈ 6x30 minutos ≈ 180 minutos			
			Electroforese em gel de agarose (preparação + electroforese + coloração + visualização)	≈ 90 minutos			
		Quantificação por <i>Real-time</i> PCR com detecção <i>SYBRGreen</i>		≈ 90 minutos			

FISH	- Microscópio de epifluorescência	Construção de sondas oligonucleotídicas + Marcação das sondas com FICT		-	≈ 300 minutos ≈ 5 horas	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Igen <i>et al.</i>, 2006</li> <li>• Tate e Ostroff, 2002</li> </ul>	<u><b>Aplicações:</b></u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detecção e quantificação</li> <li>- Possível análise comparativa com automatização</li> </ul> <u><b>Limitações:</b></u> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Requer informação de bases de dados limitando-se à informação que se encontra disponível</li> <li>- Implica estudo para determinar as condições de especificidade (restringência óptima) de cada sonda</li> <li>- Trabalhoso ao nível da espécie</li> <li>- Elevado <i>background</i> devido a autofluorescência dos substratos</li> </ul>
		FISH	Fixação bactérias	≈ 120 minutos			
			Hibridação das sondas	≈ 150 minutos			
		Coloração com DAPI		≈ 30 minutos			

## 6 Aplicações com o Contributo dos Métodos Moleculares

Neste capítulo serão descritas três situações que podem, eventualmente, ocorrer nas indústrias e que podem requerer o recurso a serviços de laboratório utilizando métodos moleculares. Far-se-á uma sugestão de serviço para responder a cada problema.

Estas situações poderão constituir uma necessidade das indústrias e as soluções uma possibilidade de serviço e de negócio para laboratórios.

### 6.1 Situação 1 – corrosão numa conduta de resfriamento de uma indústria

#### **Problema:**

Ao longo de uma conduta de resfriamento de uma indústria é detectada corrosão da tubagem a partir de um certo ponto (Figura 6.1).

Os responsáveis da indústria têm o interesse em descobrir a origem de contaminação.

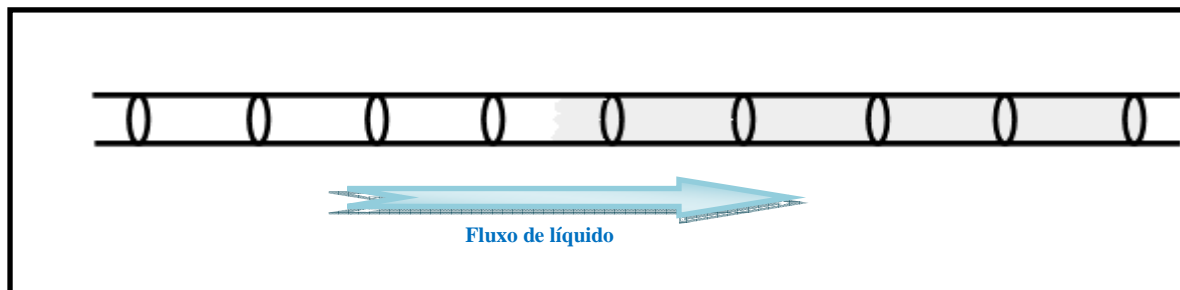


Figura 6.1 – Tubagem de conduta de resfriamento evidenciando corrosão.

**Solução:** *Source Tracking*, através da estratégia DGGE utilizando *primers* universais para alvos de rRNA16S.

O *Source Tracking*, determinação de fontes específicas de contaminação bacteriana, pode ser feito utilizando diversas metodologias: moleculares, bioquímicas e químicas (Meays *et al.*, 2004). Pode auxiliar na resolução de problemas de poluição ambiental, doenças infecciosas humanas causadas por alimentos, etc (Meays *et al.*, 2004 e Power *et al.*, 2007).

### **Esquema experimental:**

Ao longo da conduta escolhem-se três pontos de amostragem (A, B e C), sendo efectuadas três recolhas em cada um destes pontos (Figura 6.2).

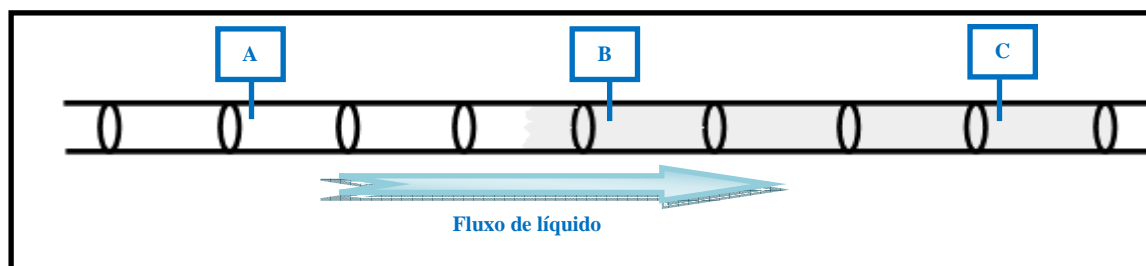



Figura 6.2 – Pontos de amostragem ao longo de uma conduta evidenciando corrosão .

Para cada amostra realiza-se uma análise da diversidade microbiana através da estratégia PCR-DGGE (uma etapa) utilizando o par de *primers* 341F(GC)/518R, representado na Tabela 5.1. Esta combinação de *primers* é usada para a amplificação de genes do rRNA 16S adequados para a análise por DGGE (Muyzer *et al.*, 1993).

Em cada tubo de reacção PCR colocam-se 2  $\mu\text{L}$  de cada *primer* (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de cada dNTP (10 mM), 10  $\mu\text{L}$  de tampão 10xPCR (HT Biotech), 0,2  $\mu\text{L}$  BSA 10% (p/v), 1 Unidade SuperTaq polimerase (HT Biotech), 100 ng de DNA e cerca de 85  $\mu\text{L}$  de água destilada, tal como descrito em Daly *et al.* (2000). Em cada reacção PCR utiliza-se um controlo positivo com a estirpe de referência indicada na Tabela 5.1.

Segue-se uma análise comparativa dos perfis DGGE obtidos nos diferentes pontos de amostragem e a sequenciação de determinadas bandas excisadas dos géis e procede-se-se à sua identificação através de comparação com bases de dados. As bandas que surgem nas amostras correspondentes aos pontos B e C (com corrosão) e que não surgem nas amostras do ponto A (sem corrosão) podem ser importantes para determinar a fonte de contaminação.

Na Figura 6.3 está representado o esquema experimental da análise da diversidade microbiana nos três pontos de amostragem por DGGE.

A estratégia acima descrita poderá aplicar-se a qualquer contaminação de origem microbiana e não apenas ao problema de corrosão aqui descrito. No caso de se ter conhecimento que o problema é causado por um grupo específico de bactérias, como por exemplo por SRB, pode aplicar-se a estratégia *nested*-PCR-DGGE, utilizando *primers* específicos para SRB, descrita no capítulo 5.1.

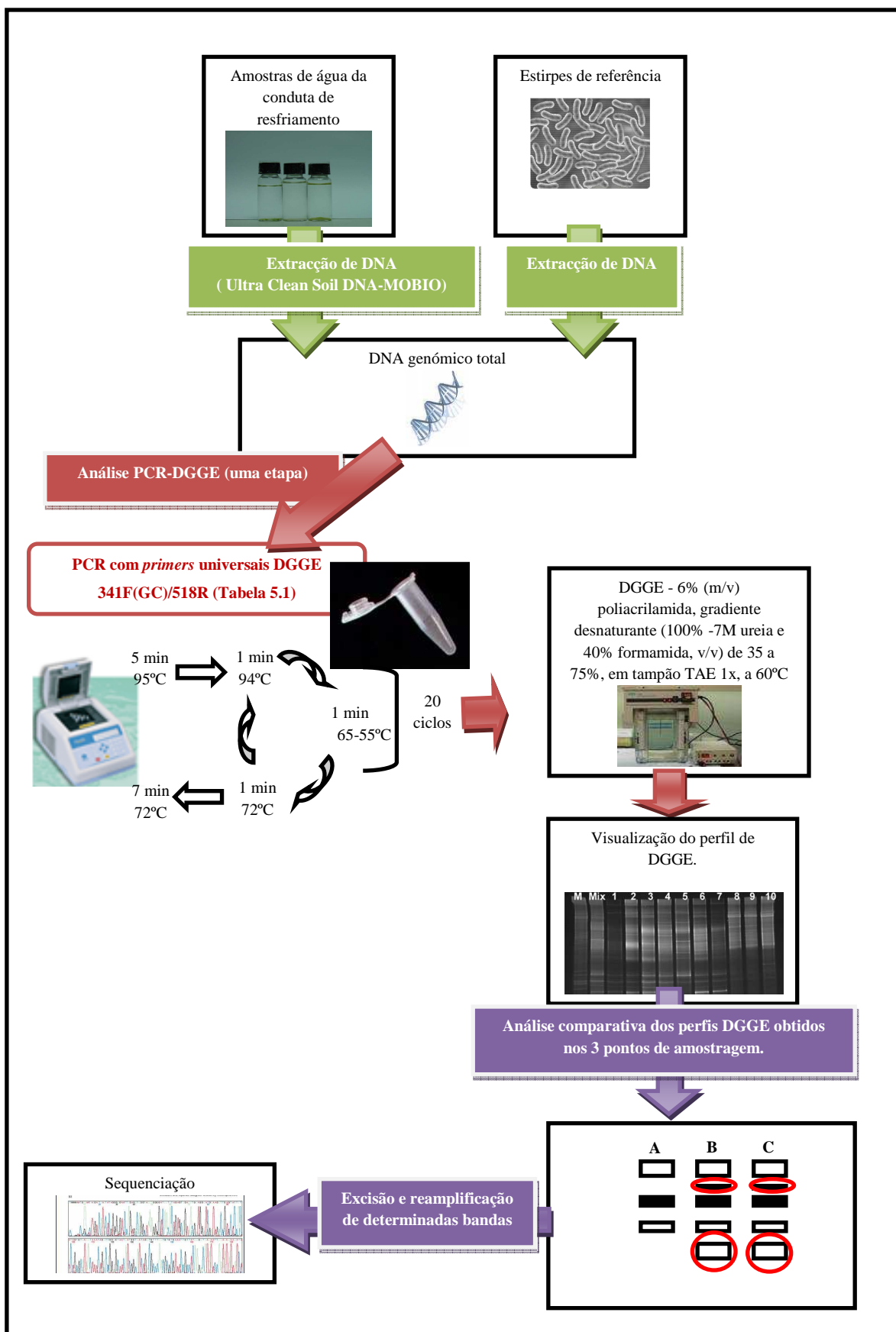


Figura 6.3 – Esquema experimental da análise da diversidade microbiana por PCR-DGGE (uma etapa).

## **6.2 Situação 2 – contributo para a resolução de problemas de corrosão provocados por SRB**

### **Problema:**

Em determinadas indústrias ocorrem problemas de biocorrosão das instalações provocados por biofilmes anaeróbios contendo SRB.

Uma das estratégias tomadas para diminuir a ocorrência de corrosão é a utilização de produtos químicos com propriedades antimicrobianas, como os biocidas no controlo dos biofilmes ou o recurso a revestimentos *anti-fouling* (anti-incrustantes). Porém, tal estratégia apesar de eficaz, pode ser nefasta para o ambiente uma vez que estas substâncias são tóxicas e frequentemente provocam poluição (Videla *et al.*, 2005). Os sistemas industriais que implementam programas de tratamento com recurso a biocidas ou revestimentos *anti-fouling*, mais tarde ou mais cedo irão descarregar para o ambiente efluentes que apresentarão concentrações residuais dos agentes antimicrobianos. Desta forma, a sua utilização frequente torna-se inaceitável do ponto de vista ambiental, uma vez que irá perturbar outras formas de vida (Pereira, 2001). Como resultado disso, a sua utilização tem vindo a ser regulada, nomeadamente através da legislação. O Decreto-Lei n.º 121/2002 de 3 de Maio, estabelece entre outras coisas, as normas e procedimentos a que deve obedecer a colocação no mercado de produtos biocidas e impõe as condições da sua utilização (Ministério da Saúde, 2002).

Assim, ao conhecer-se a origem de contaminação microbiana que está a causar problemas de corrosão num determinado ponto de um processo industrial, é possível definir mais adequadamente as quantidades e tipos de biocida a aplicar, bem como, os locais de aplicação mais pertinentes.

Por outro lado, em determinadas indústrias onde se sabe que a principal causa de biocorrosão é um grupo particular de bactérias associadas a essas indústrias, como por exemplo as SRB, outras medidas podem ser tomadas se se conhecer qual o género ou grupo de SRB que estão a provocar a corrosão. No caso das SRB, algumas das condições de crescimento, nomeadamente, a temperatura óptima de crescimento e os substratos utilizados, são variáveis nos diferentes géneros, tal como está representado na Tabela 3.1. Assim, a alteração controlada destas condições pelos responsáveis industriais pode ser usada como forma de controlo do crescimento de determinadas bactérias que causam problemas.

Algumas técnicas moleculares podem dar um contributo para a rápida identificação de bactérias.

**Solução:** Identificação do agente da biocorrosão (SRB) através da estratégia *nested*-PCR-DGGE utilizando *primers* para alvos de rRNA16S de grupos específicos de SRB.

**Esquema experimental:**

Ao longo das instalações industriais escolhem-se diferentes pontos de amostragem com ou sem evidência de corrosão, sendo efectuadas três recolhas em cada um destes pontos.

Para cada amostra realiza-se uma análise da diversidade microbiana através da estratégia *nested*-PCR-DGGE (duas etapas). Esta abordagem consiste em duas fases de amplificação:

- 1º- Uma primeira amplificação usando *primers* para alvos de rRNA 16S de grupos específicos de SRB;
- 2º- O produto obtido é usado numa segunda amplificação usando o par de *primers* 341F(GC)/518R, de modo a criar produtos adequados à análise DGGE (Muyzer *et al.*, 1993).

Todos estes primers estão representados na Tabela 5.1.

Em cada tubo de reacção PCR colocam-se 2 µL de cada *primer* (10 pmol/µL), 2 µL de cada dNTP (10 mM), 10 µL de tampão 10xPCR (HT Biotech), 0,2 µL BSA 10% (p/v), 1 Unidade Super*Taq* polimerase (HT Biotech), 100 ng de DNA e cerca de 85 µL de água destilada, tal como descrito em Daly *et al.* (2000). Em cada reacção PCR utiliza-se um controlo positivo com a estirpe de referência indicada na Tabela 5.1.

Segue-se uma análise comparativa dos perfis DGGE obtidos nos diferentes pontos de amostragem e a sequenciação de determinadas bandas excisadas dos géis e procede-se-se à sua identificação através de comparação com bases de dados. As bandas que surgem nas amostras correspondentes aos pontos onde ocorre corrosão e que não surgem nas amostras dos pontos de amostragem sem corrosão podem ser importantes para determinar a fonte de contaminação e devem ser analisadas através de sequenciação.

Na Figura 6.4 está representado o esquema experimental da análise da diversidade microbiana nos diferentes pontos de amostragem por DGGE.

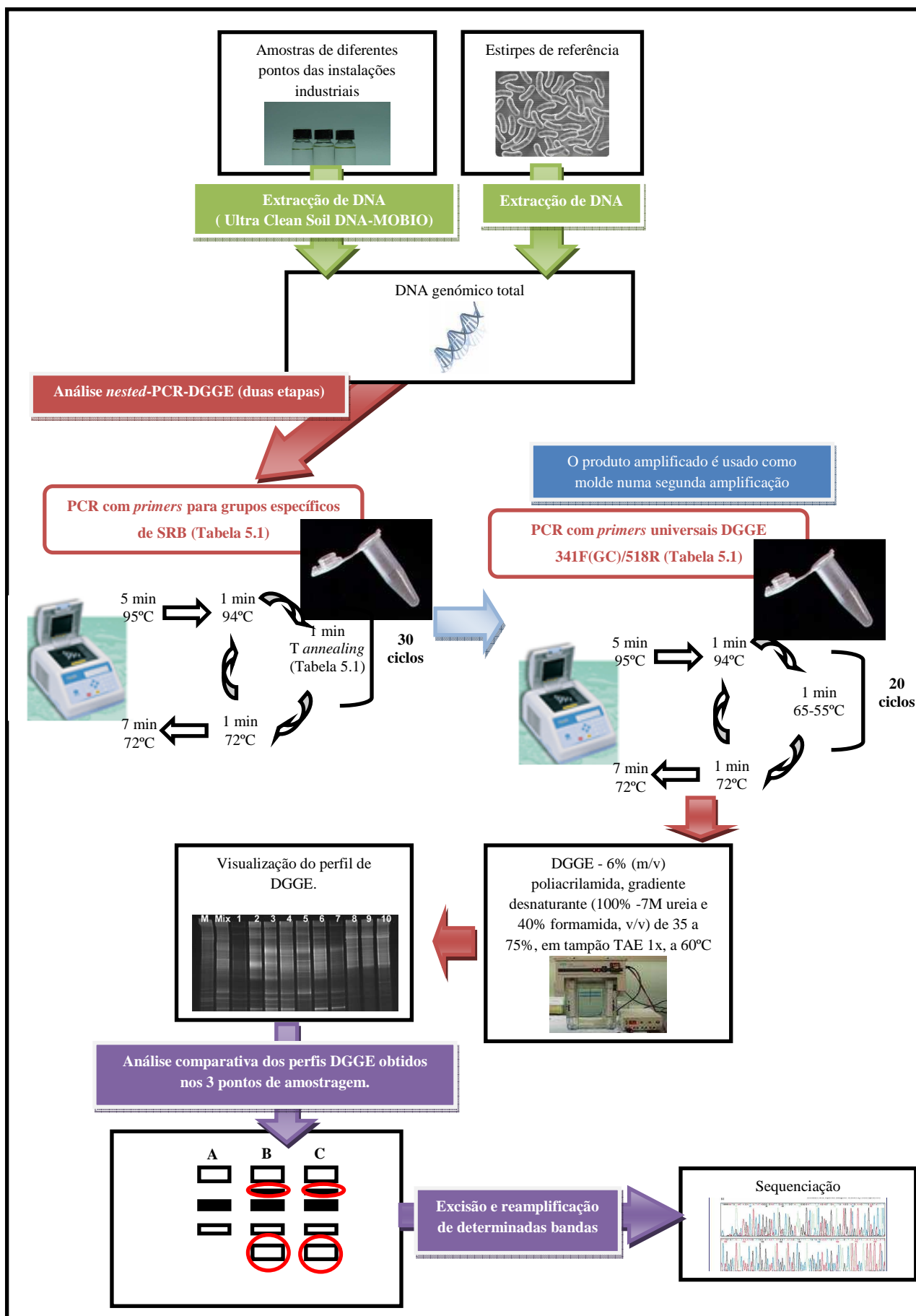


Figura 6.4 – Esquema experimental da análise da diversidade de SRB por *nested*-PCR-DGGE (duas etapas).



### **6.3 Situação 3 – biorremediação em estações de tratamento de águas residuais versus corrosão nas condutas**

#### **Problema:**

Como já foi referido no capítulo 3.2, as SRB são utilizadas na biorremediação de efluentes ricos em metais pesados (Higgins *et al.*, 2003) e no tratamento de águas e esgotos municipais e industriais (Ben-Dov *et al.*, 2007). Em condições anaeróbias, as SRB reduzem o sulfato, presente nos efluentes, a sulfureto de hidrogénio que reage com os metais precipitando-os em sulfuretos metálicos insolúveis. Este processo favorece a remoção dos metais pesados numa forma mais estável, juntamente com a diminuição do sulfato e dos compostos orgânicos dos efluentes, sendo um processo com baixo consumo energético (Higgins *et al.*, 2003 e Carlos *et al.*, 2007).

Porém o inconveniente da redução de sulfato no tratamento de águas e esgotos é a produção de sulfureto de hidrogénio, que é um composto tóxico que provoca odores desagradáveis além de potenciar a corrosão nas estações de tratamento de água (Ito *et al.*, 2002).

Os responsáveis das indústrias de tratamento de águas residuais pretendem encontrar um equilíbrio que permita a utilização eficaz de SRB na biorremediação das águas residuais, sem que esta cause graves problemas de corrosão das condutas.

**Solução:** Monitorização das condições do processo de biorremediação através da análise FISH, utilizando sondas oligonucleotídicas pré-selecionadas para alvos de rRNA 16S.

#### **Esquema experimental:**

Pretende-se estudar a diversidade e a estrutura da comunidade de SRBs em diversos locais de biorremediação de águas residuais submetidos a diferentes condições, de modo a, posteriormente, estabelecer uma relação entre as diferentes condições de biorremediação e a ocorrência de corrosão. Por outro lado, o conhecimento do género ou grupo microbiano dominante no processo de redução do sulfato, sob condições específicas pode ser útil para o desenho e aplicação de métodos de biorremediação eficazes.

As comunidades de SRB das diversas amostras recolhidas serão caracterizadas através da análise FISH, usando sondas pré-definidas, tal como representado no esquema da Figura 6.5. Este método terá como objectivos:

- efectuar estudos quantitativos de populações microbianas de modo a facilitar a identificação de modificações na população microbiana em função das condições do processo;
- controlar a ocorrência de corrosão nas condutas;
- melhorar a eficácia do método de biorremediação utilizado.

As sondas a utilizar serão sintetizadas comercialmente e marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FICT) na terminação 5'. Neste caso poder-se-iam utilizar, por exemplo, as mesmas sondas do estudo de Icgén *et al.* (2006): cinco sondas para géneros específicos e quatro sondas para grupos específicos, bem como as mesmas condições de especificidade, que estão representadas na Tabela 5.4.

Tal como no trabalho de Icgén *et al.* (2006):

- a população procariótica total será determinada com o corante DAPI.
- o número total de célula hibridadas será estimado por contagem das células que hibridam com a sonda EUB338, isto é, bactérias.
- os resultados das contagens serão corrigidos por subtracção dos sinais observados com a sonda NON338.
- as observações microscópicas e a aquisição de imagens serão realizadas com microscópio epifluorescente utilizando filtros adequados para cada corante.
- a contagem das células será efectuada, calculando a média do número de células obtidas num mínimo de 10 campos microscópicos aleatoriamente escolhidos.
- os resultados são mostrados como uma proporção de células dentro de um grupo (domínio, género ou espécie), ou seja, hibridadas com a sonda representativa desse grupo relativamente ao total de células coradas com DAPI.

Após obter a caracterização das amostras dos diferentes locais, os resultados serão listados juntamente com as condições de biorremediação e a ocorrência ou não de biocorrosão.

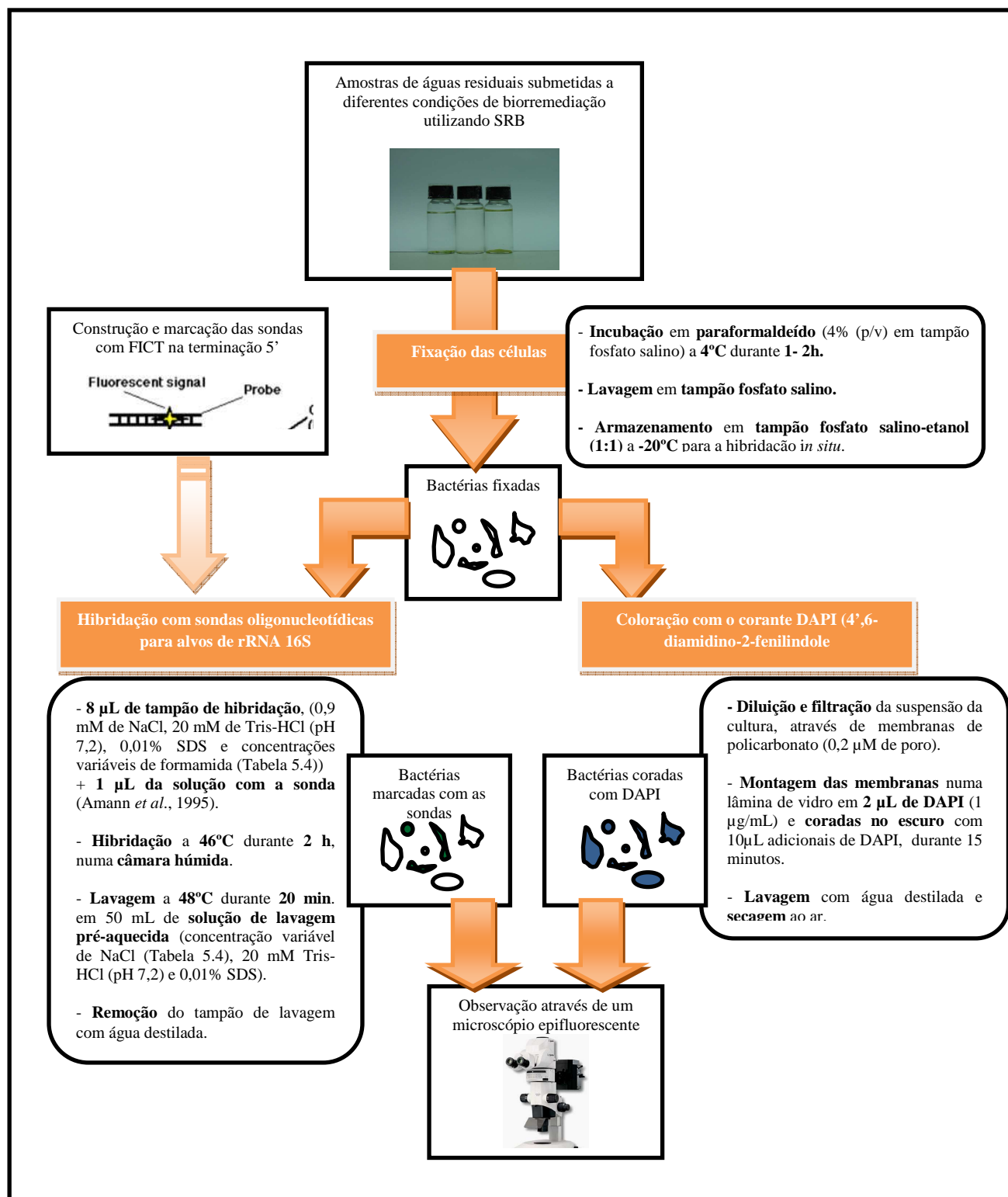


Figura 6.5 – Esquema experimental da análise FISH da diversidade e a estrutura da comunidade de SRBs em amostras de águas residuais submetidas a diferentes condições de biorremediação.

# 7 Considerações Finais e Perspectivas Futuras

## 7.1 Considerações Finais

Nas últimas décadas, o empreendedorismo encontra-se na ordem do dia e muitos são os factores que contribuem para o seu desenvolvimento e aplicação em diversas áreas. Entre os factores de empreendedorismo contam-se as alterações na economia, a globalização, o incentivo à inovação e ao desenvolvimento tecnológico por parte dos governos e a escassez de emprego que promovem a necessidade de um espírito empreendedor nos cidadãos.

Em Portugal a actividade empreendedora ainda se situa bastante abaixo da média de todos os países analisados pelo *Global Entrepreneurship Monitor* (GEM). Para esta fraca actividade empreendedora contribuem diversos factores, entre os quais:

- Aversão ao risco e incapacidade para lidar com o fracasso por parte da generalidade dos portugueses;
- Pequena capacidade financeira dos empreendedores aliada a dificuldades de acesso a recursos financeiros;
- Baixa transferência de resultados de I&D com consequente fraca oferta de serviços e de produtos inovadores;
- Instabilidade política e elevada burocracia;
- Sistema educacional inadequado ao desenvolvimento de capacidades empreendedoras;
- Concorrência entre “velhos negócios” e “novos negócios”.

Como aspectos positivos que podem favorecer o desenvolvimento de empreendedorismo em Portugal contam-se, entre outros:

- Existência de estrutura de I&D adequadas;
- Recursos humanos qualificados e *know-how* ao nível das empresas de biotecnologia;
- Conjuntura propícia ao empreendedorismo com diversos programas de apoio;
- Aumento do número de Parques de Ciência e Tecnologia e incubadoras de empresas.

Assentando o empreendedorismo numa busca e descoberta de novos negócios é essencial que ele seja também aplicado a áreas científicas como é o caso da Microbiologia,

surgindo assim o bioempreendedorismo que se baseia na criação de projectos e negócios utilizando o conhecimento científico e a biotecnologia.

O ponto de partida para a definição de um tema de pesquisa, que relacionasse o bioempreendedorismo com a microbiologia, foi a procura de metodologias de detecção, identificação e quantificação de microrganismos que constituíssem um bom contributo na resolução de problemas microbiológicos ao nível das indústrias. Assim, para além de se encontrar soluções na melhoria de processos industriais seria igualmente possível criar oportunidades de negócio para os laboratórios que desenvolvem estas metodologias. Desta forma, começou-se por se seleccionar um grupo de microrganismos que pudesse causar problemas ao nível industrial, chegando-se às bactérias redutoras do sulfato – SRB.

A escolha do grupo de microrganismos prendeu-se com a sua importância ambiental e económica.

Este grupo de bactérias anaeróbias apresenta alguma diversidade de morfologias, mobilidades e até na utilização de diferentes substratos, sendo um grupo heterogéneo ao nível filogenético. Dada esta diversidade, as SRB são um grupo com grande ubiquidade, podendo viver em diversos ambientes naturais e industriais, incluindo ambientes aeróbios, já que algumas SRB demonstraram ter tolerância ao oxigénio, e ainda determinados ambientes extremos, dado que algumas espécies são termofílicas.

Em ambientes anaeróbios, reduzem o sulfato a sulfureto de hidrogénio, numa reacção designada redução desassimilativa do sulfato, ao mesmo tempo que promovem a degradação da matéria orgânica. São por isso bactérias importantes no ciclo do enxofre, sendo a reacção de redução do sulfato facilmente reconhecível na natureza graças ao odor a “ovo podre”, resultante da produção de sulfureto de hidrogénio.

A relevância económica das SRB é justificada quer pela sua intervenção em processos de biorremediação de esgotos e águas residuais, quer pelos prejuízos causados pela biocorrosão, desencadeada por estas bactérias, em equipamentos industriais. Foi sobretudo a forte relação deste grupo de bactérias com os fenómenos de biocorrosão que justificou a sua escolha para pesquisa. As SRB são apontadas como o grupo responsável pelos casos mais graves de biocorrosão de materiais de ferro e de aço usados na indústria.

A corrosão mediada por SRB pode ser atribuída sobretudo a três factores:

- formação de biofilmes e produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que favorecem as incrustações das superfícies;
- produção de metabolitos corrosivos como o sulfureto de hidrogénio;
- despolarização catódica.

De facto, a biocorrosão afecta diversas indústrias, um pouco por todo o mundo e provoca elevados prejuízos económicos relacionados, não só, com a diminuição da eficiência de processos, mas também, com paragens das instalações para substituição de estruturas corroídas ou limpezas, remoção de depósitos biológicos em sistemas de armazenamento e tubagens, etc.

Com o objectivo de melhorar os processos de biorremediação recorrendo às SRB ou de elaborar métodos de monitorização e controlo do fenómeno de biocorrosão relacionados com as SRB, pode ser útil estudar e caracterizar as populações microbianas responsáveis por estes processos. O conhecimento do género ou grupo microbiano dominante no processo de redução do sulfato, sob condições específicas, pode ajudar na resolução de problemas relacionados com as SRB. Para tal foi crucial o desenvolvimento de métodos rápidos de detecção e quantificação de SRB em ambientes naturais e industriais.

As SRB podem ser detectadas recorrendo a métodos clássicos ou a métodos moleculares.

Os métodos clássicos, baseados no cultivo de microrganismos, permitem a caracterização fenotípica e estrutural dos mesmos. Porém, não contemplam as bactérias não cultiváveis em meio laboratorial ou de difícil cultivo, como é o caso de algumas espécies de SRB e são incompatíveis com as taxas lentas de crescimento e também com as exigências destas bactérias, relativamente a meios selectivos.

Por outro lado, os métodos moleculares utilizam uma abordagem genotípica para caracterizar determinados genes do genoma bacteriano, permitindo a identificação e monitorização mais eficaz dos microrganismos responsáveis por determinado processo. São adequados ao estudo da composição e estrutura de comunidades microbianas complexas e são mais sensíveis permitindo também estudar os microrganismos não cultiváveis presentes numa comunidade microbiana.

A abordagem molecular tem desencadeado novas oportunidades de negócio para os laboratórios, já que estes métodos possibilitam uma resposta mais rápida e credível na detecção e identificação de bactérias que causam problemas nas indústrias como as SRB. Nesta tese foram seleccionados três tipos de métodos moleculares para análise, dois dos quais indirectos (PCR-DGGE e *Real-time PCR*) e um directo (FISH).

### **PCR-DGGE**

O desenvolvimento da técnica de PCR, que possibilita a rápida obtenção de múltiplas cópias de um determinado fragmento de DNA de interesse, e ainda o desenvolvimento de processos de sequenciação automática, permitiram a generalização de abordagens moleculares baseadas na análise de sequências de genes e construção de filogenias no estudo da diversidade bacteriana de várias comunidades ambientais. O facto da sequência de algumas regiões do DNA bacteriano ser determinante para identificar os microrganismos, faz com que esta tecnologia seja o método de eleição utilizado para a sua identificação.

No que diz respeito à identificação de estirpes bacterianas, a abordagem baseada na amplificação e sequenciação de regiões do gene que codifica para o rRNA 16S é o método mais utilizado, sobretudo devido ao rápido crescimento de bases de dados destas sequências, acessíveis via internet. Porém, este gene pode apresentar baixa resolução ao nível da espécie o que torna difícil a diferenciação e classificação baseada unicamente na sua sequenciação. Uma alternativa é a utilização de genes funcionais como alvos para a detecção e identificação dos microrganismos em estudo, como é o caso dos genes *dsrA* e *apsA* para as SRB. Estando directamente relacionados com a fisiologia dos microrganismos, a utilização destes genes apresenta ainda a vantagem de contribuir para o esclarecimento das suas funções metabólicas dentro da comunidade. Uma limitação da utilização destes genes é o número de sequências disponíveis nas bases de dados para comparação e definição de *primers*.

Uma das metodologias para a caracterização de comunidades microbianas naturais é a determinação da sua diversidade genética através da técnica DGGE, que possibilita a análise de produtos de PCR de acordo com a sua sequência de pares de bases, representando uma poderosa ferramenta para estudos ecológicos com microrganismos,

dado que moléculas de DNA com sequências diferentes apresentam taxas de migração diferentes num gel com gradiente desnaturante. Como tal, tem sido uma metodologia utilizada para determinar a presença e distribuição de SRB em diversos ambientes.

Através desta análise obtém-se um padrão de bandas característico para cada comunidade em determinadas condições ambientais, sendo possível a comparação quer entre comunidades diferentes, quer entre diferentes momentos na mesma comunidade. A análise destas alterações, espaciais e temporais, pode constituir uma ferramenta útil na monitorização de processos industriais. Além disso, é possível proceder à identificação de um determinado microrganismo da comunidade através da sequenciação do fragmento correspondente retirado do gel.

No entanto, a análise de padrões pode ser ambígua quando se tratam de comunidades muito complexas, estimando-se que apenas as populações bacterianas presentes em mais do que 1% na comunidade podem ser detectadas por PCR-DGGE. Esta limitação pode ser ultrapassada através da utilização de *primers* específicos para determinados grupos, numa estratégia designada *nested*-PCR-DGGE e descrita no capítulo 5.1. Esta última estratégia permite obter um padrão DGGE constituído apenas por bandas pertencentes ao grupo específico em estudo e além disso, como se trata de um procedimento no qual são feitas várias amplificações, possibilita o estudo da diversidade bacteriana em comunidades complexas contendo um determinado grupo bacteriano em baixo número, como é o caso das SRB em algumas comunidades ambientais.

Apesar das limitações associadas à PCR e, consequentemente, a todas as técnicas em si baseadas, têm havido melhorias notáveis, não só pela existência de novos equipamentos mais eficazes, como pelo uso de *Taq* DNA polimerases mais fiáveis, introduzindo menos erros e capazes de amplificar fragmentos maiores e também pela melhoria no desenho de *primers* e no controlo e monitorização das fontes de contaminação exógena.

Assim, as suas vantagens e aplicações fazem da PCR, associada à análise DGGE, uma tecnologia chave para a análise da diversidade microbiana e identificação de microrganismos específicos de comunidades ambientais.

No caso da resolução de problemas relacionados com SRB pode ser importante para determinar a origem de contaminação microbiana numa determinada instalação industrial (capítulo 6.1) ou para melhor caracterizar, compreender e ajudar a resolver o processo de



biocorrosão mediado por SRB que ocorre em diversas instalações industriais (capítulo 6.2). Desta forma, este tipo de abordagem pode ser um forte contributo para se fazer uma rápida caracterização das comunidades microbianas associadas ao fenómeno de biocorrosão de uma dada instalação industrial, o que pode proporcionar um tratamento mais preciso e eficaz.

### ***Real-time PCR***

Uma das principais limitações das metodologias baseadas na PCR convencional é a sua incapacidade para a quantificação dos grupos microbianos numa comunidade.

O *real-time PCR* permite ultrapassar essa limitação, permitindo amplificar e simultaneamente quantificar uma molécula alvo de DNA, uma vez que a colheita de dados é efectuada à medida que o DNA amplificado se acumula após cada ciclo de amplificação, durante a fase exponencial. A detecção é feita por fluorescência, sendo o aumento do sinal de fluorescência proporcional ao número de amplicões formado. Além disto, o *real-time PCR* apresenta ainda outras vantagens relativamente ao PCR convencional, sendo mais sensível e tendo menor risco de contaminação.

Trata-se de uma técnica altamente sensível para a identificação e quantificação de bactérias, facilitando a análise bacteriana de amostras ambientais. Por este facto, pode constituir um bom contributo na resolução de problemas com SRB, como por exemplo a monitorização de processos de biorremediação de efluentes industriais contendo sulfato e o controlo da biocorrosão das instalações de tratamento de águas residuais. Seria possível, por exemplo, numa estação de tratamento de esgotos contendo sulfato, saber qual o limite de SRB que devem estar presentes para que a produção de sulfureto durante a respiração anaeróbia das SRB, não se torne uma ameaça para a corrosão das tubagens.

O principal inconveniente desta metodologia prende-se com o facto de implicar um estudo prévio, como a construção de bibliotecas de clones para a construção de primers, e o desenvolvimento de curvas padrão de forma a optimizar o processo. Isto pode tornar a técnica pouco viável em termos de rapidez, comparativamente com os resultados que fornece e que podem também ser obtidos com a tecnologia FISH. Por outro lado e uma vez que isto implica um maior número de procedimentos laboratoriais torna-se também mais caro. Por este motivo, esta metodologia não foi tida em consideração no capítulo 6 da tese.

## FISH

A tecnologia FISH é usada para detectar e localizar sequências específicas de ácidos nucleicos nas células, através da utilização de sondas fluorescentes altamente específicas, sendo a detecção do local de ligação da sonda efectuada através de microscopia por fluorescência. Trata-se de uma abordagem adequada ao estudo da composição e estrutura de comunidades microbianas complexas, no seu habitat natural.

Sendo um método directo, tem a vantagem de ser independente da extracção e purificação de DNA, que muitas vezes são procedimentos selectivos e redutores, e pode ser usada em células bacterianas intactas, permitindo quer a detecção de bactérias específicas, quer a sua quantificação em comunidades complexas. Permite ainda, a detecção simultânea de múltiplos alvos e é uma metodologia rápida e segura.

As sondas FISH bacterianas são frequentemente *primers* para a região do rRNA 16S, embora também seja possível utilizar genes funcionais para a construção de sondas.

Apesar de certas limitações que esta técnica pode apresentar, como problemas de especificidade das sondas e de elevado autofluorescência dos substratos, variáveis como o estado fisiológico das células e a sua permeabilização, bem como, a necessidade de conhecimento prévio da sequência alvo na definição das sondas, o FISH constitui uma abordagem útil para compreender a dinâmica espacial e temporal das populações bacterianas individuais na sua comunidade, podendo ainda fornecer uma avaliação relativa à actividade microbiana.

Desta forma, o FISH pode ter utilidade para monitorizar as condições de um dado processo de biorremediação de esgotos industriais utilizando SRB de forma a otimizar o método de biorremediação utilizado e, simultaneamente, controlar a ocorrência de corrosão nas instalações industriais causada pelas SRB (capítulo 6.3).

Contudo, é possível concluir que para fornecer a descrição completa da diversidade populacional e da estrutura de uma comunidade é necessário combinar a metodologia FISH com métodos baseados na PCR, uma vez que estes últimos, permitem identificar espécies adicionais para as quais não foram seleccionadas sondas. A análise FISH complementa os métodos não quantitativos baseados no PCR fornecendo a abundância relativa de cada grupo bacteriano.

## **7.2 Perspectivas Futuras**

Esta tese de mestrado deixa algumas questões em aberto e que podem ser encaradas como novas possibilidades de investigação futura.

No que diz respeito à utilidade de cada um dos métodos descritos, seria importante desenvolver estudos de mercado ao nível das indústrias para verificar até que ponto estas tecnologias moleculares estão a ser utilizadas e qual a sua receptividade e o seu contributo na resolução de problemas.

Este estudo de mercado às indústrias poderia ser comparado com um estudo feito junto dos laboratórios que disponibilizam este tipo de serviços, de forma a compreender se se trata de um bom negócio para os laboratórios.

Para complementar esta informação seria importante comparar a actividade desenvolvida pelos laboratórios ao longo dos últimos 30 anos, no que diz respeito aos serviços utilizados para detecção, identificação e quantificação de microrganismos, nomeadamente SRB. Desta forma seria possível avaliar o efeito empreendedor que os métodos moleculares trouxeram aos laboratórios, quer ao nível do crescimento da oferta e optimização dos serviços disponibilizados, quer ao nível dos lucros obtidos nesta actividade. Seria também possível inferir sobre o potencial de crescimento deste tipo de empresas de prestação de serviços nos mercados actual e futuro.

Sendo a Microbiologia e a Biotecnologia, áreas em presente e constante evolução, é natural que novas abordagens para a detecção, identificação e quantificação bacterianas estejam a ser investigadas. Ao mesmo tempo, é importante um investimento nas actuais estratégias, no sentido da sua optimização e de forma a permitir ultrapassar as suas actuais limitações. Desta forma, novos serviços poderão ser disponibilizados pelos laboratórios no auxílio da resolução de problemas com SRB, quer a nível ambiental, quer a nível industrial.

## 8 Referências Bibliográficas

- Acs, Z., Arenius, P., Hay, M., Minniti, M. 2005. Global Entrepreneurship Monitor: 2004 Executive Report. London: London Business School and Babson College. Technical Report.
- Alípio, S. 2006. Guia do Empreendedorismo - Estruturas e Apoios ao Empreendedorismo em Portugal. Lisboa: Associação Nacional de Jovens Empresários. Technical Report.
- Amann, R. I. Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6):1919–1925.
- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbiological Reviews* 59(1):143-169.
- Amann, R. I., Stronley, J., Devereux, R., Key, R., Stahl, D. A. 1992. Molecular and Microscopic Identification of Sulfate-Reducing Bacteria in Multispecies Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(2):614–623.
- Andrez, J. 2006. O Empreendedorismo em Portugal: das barreiras aos factores e mecanismos de incentivo ao desenvolvimento do Empreendedorismo. In: Dianova Portugal (Internet). (actualizado em 2006 Jun). Torre Vedras: Associação Dianova Portugal; (visitado 2008 Oct 27). Disponível em: [http://www.dianova.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=221&Itemid=131](http://www.dianova.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=221&Itemid=131)
- Ayazi, M., Mirfenderski, S., Moghadam, A. A., Monavarian, M. R. 2006. Study of the corrosion factors in offshore oil production units. *Petroleum & Coal* 48(2):6-10.
- Baptista, R., Escária, V., Madruga, P. 2005. Entrepreneurship, Regional Development and Job Creation: The case of Portugal. In: Discussion papers on entrepreneurship, growth and public policy. Group Entrepreneurship, Growth and Public Policy, MPI Jena, 46 pp.

- Bartlett, J. M. S. 2004. Fluorescence *In Situ* Hybridization: Technical Overview. In: Roulston, J. E., Bartlett, J. M. S., editors. *Methods in Molecular Medicine: Molecular Diagnosis of Cancer*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 77-87.
- Beech, I. B. 2003. Sulfate-reducing bacteria in biofilms on metallic materials and corrosion. *Microbiology Today* 30:115-117.
- Beech, I. B., Cheung, C. W. S., Chan, C. S. P., Hill, M. A., Franco, R. , Lino, A-R. 1994. Study of parameters implicated in the biodeterioration of mild steel in the presence of different species of sulphate-reducing bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 34:289-303.
- Beech, I. B., Gaylarde, C. C. 1999. Recent advances in the study of biocorrosion - an overview. *Rev. Microbiol.* 30(3):177-190.
- Beech, I. B., Sunner, J. A., Hiraoka, K. 2005. Microbe–surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *Int. Microbiol.* 8:157-168.
- Ben-Dov, Eitan, Brenner, A. Kushmaro, A. 2007. Quantification of Sulfate-reducing Bacteria in Industrial Wastewater, by Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) using *dsrA* and *apsA* Genes. *Microbial Ecology* 54:439-451.
- Bernardez, L. A., Lima, L. R. P. A., Souza, E. R., Almeida, P. F. 2007. Selecção de materiais para bioreactores operando com bactérias redutoras de sulfato. (Salvador da Bahia): Boletim Técnico da Petrobrás. Technical Report.
- Carlos, M. C., Lemos, J. L. S., Rizzo, A. 2007. Remediação de rejeitos industriais empregando microorganismos. In: XV Jornada de Iniciação Científica – CETEM; 2007 July 26-27; Rio de Janeiro: Centro da Tecnologia Mineral (CETEM).
- Castro, H. F., Williams, N. H., Ogram, A. 2000. Phylogeny of sulfate-reducing bactéria. *FEMS Microbiology Ecology* 31:1-9.
- Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (Internet). (actualizado em 2008 Sept 26). Aveiro: Instituto de Investigação da Universidade de Aveiro; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: <http://www.cesam.ua.pt/>
- Centro de Inteligência em Inovação. 2005. Diagnóstico do sector da Biotecnologia e das Ciências da Vida em Portugal. Lisboa: Centro de Inteligência em Inovação. Technical Report.

- Centro Regional para a Inovação do Algarve (Internet). (actualizado em 2007). Faro: Universidade do Algarve; (visitado 2008 Oct 27). Disponível em: <http://www.cria.pt/cria/PT/iniciativas.asp?id=27>
- Chan, K. Y., Xu, L. C., Fang, H. H. P. 2002. Anaerobic Electrochemical Corrosion of Mild Steel in the Presence of Extracellular Polymeric Substances Produced by a Culture Enriched in Sulfate-Reducing Bacteria. *Environ. Sci Technol.* 36:1720-1727.
- Chaudhuri, S. R., Pattanayak, A. K., Thakur, A. R. 2006. Microbial DNA extraction from samples of varied origin. *Current Science* 91(12):1697-1700.
- Chaves, S. I. M. L. 2005. Diversidade de Procariotas Sulfato-Redutores e Desnitrificantes em Amostras Ambientais (Tese de Doutoramento). (Lisboa): Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa. p. 5-27.
- Coates, J.D., Anderson, R.T. and Lovley, D.R. 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(3):1099-1101.
- Comissão Europeia. 1998. Fostering Entrepreneurship in Europe: Priorities for the future. In: Communication from the Commission to the Council; 1998 April 7; Brussels. COM(98) 222 final.
- Correia, A. 2007. Abordagens moleculares ao estudo de comunidades bacterianas. In: Ciclo de palestras do CESAM; 2007 Maio 7; Aveiro: Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia.
- Crafts, N. 2000. Globalization and growth in twentieth century. Washington (DC): International Monetary Fund. Technical Report.
- Cunha, P. S., Mouraz, A. M., Silva, M. et al. 2006. As Infra-estruturas tecnológicas no sistema nacional de inovação: Evolução 1996-2005. Lisboa: Agência de Inovação. Technical Report.
- Dahllöf, I. 2002. Molecular community analysis of microbial diversity. *Current Opinion in Biotechnology* 13:213–217.
- Daly, K, Sharp, R. J., McCarthy, A. J. 2000. Development of oligonucleotide probes and PCR primers for detecting phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria. *Microbiology* 146:1693-1705.

- Dar, S. A., Kuenen, J. Gijs, Muyzer, G. 2005. Nested PCR-Desaturating Gradient Gel Electrophoresis approach to determine the diversity of Sulfate-Reducing Bacteria in Complex Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(5):2325-2330.
- Davey, M. E., O'Toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64(4):806-811.
- Devereux, R., Kane, M. D., Winfrey, J., Stahl, D. A. 1992. Genus and group specific hybridization probes for determinative and environmental studies of sulfate-reducing bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 15:601-609.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., Raoult, D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38(10):3623–3630.
- Drucker, P. 1993. *Innovation and Entrepreneurship*. New York: Harper Business edition. p. 1-18.
- Dutta, S., Mia, I. 2007. *The Global Information Technology Report 2007-2008*. Geneva: World Economic Forum. Technical Report.
- e-escola Universidade Técnica de Lisboa (Internet). (actualizado em 2005 November 24). Lisboa: Instituto Superior Técnico; (visitado 2008 October 11). Disponível em: <http://www.e-escola.pt/site/topico.asp?topico=339>
- Eiben, B., Trawicki, W., Hammans, W., Goebel, R., Pruggmayer, M., Epplen, J. T. 1999. Rapid Prenatal Diagnosis of Aneuploidies in Uncultured Amniocytes by Fluorescence *in situ* Hybridization. *Fetal Diagn Ther.* 14:193–197.
- Elahi, E., Ronaghi, M. 2004. Pyrosequencing. A Tool for DNA Sequencing Analysis. In: Zhao, S., Stodolsky, editors. *Methods in Molecular Biology: Bacterial Artificial Chromosomes: Library Construction, Physical Mapping, and Sequencing*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 211-219.
- Empresa na Hora (Internet). (actualizado em 2006). Lisboa: Secretaria de Estado da Justiça; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: <http://www.empresanahora.mj.pt/>
- Etzkowitz, H. 2001. The Second Academic Revolution and the Rise of Entrepreneurial Science. *IEEE Technology and Society Magazine* 22 (2): 18-29.
- Eysers, L., Agathos, S. N., Fantroussi, S. E. 2004. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) as a Fingerprinting Tool for Analyzing Microbial Communities in Contaminated Environments. In: Spencer, J. F. T., Spencer, A. L. R.,

- editors. *Methods in Biotechnology: Environmental Microbiology: Methods and Protocols*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 407-417.
- Fang, H. H. P., Xu, L. C., Chan, K. Y. 2002. Effects of toxic metals and chemicals on biofilm and biocorrosion. *Water Research* 36:4709–4716.
  - Friedrich, M. W. 2002. Phylogenetic Analysis Reveals Multiple Lateral Transfers of Adenosine-5'-Phosphosulfate Reductase Genes among Sulfate-Reducing Microorganisms. *Journal of Bacteriology* 184(1):278-289.
  - Fukui, M., Teske, A., Aßmus, B., Muyzer, G., Widdel, F. 1999. Physiology, phylogenetic relationships, and ecology of filamentous sulfate-reducing bacteria (genus *Desulfonema*). *Arch. Microbiol.* 172(4):193-203.
  - Gabinete de Gestão do PRIME (Internet). (actualizado em 2008 Nov 2). Lisboa: Ministério da Economia e da Inovação; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: [http://www.prime.min-economia.pt/PresentationLayer/prime\\_Home\\_00.aspx?activeitem=0&idioma=1](http://www.prime.min-economia.pt/PresentationLayer/prime_Home_00.aspx?activeitem=0&idioma=1)
  - Gabor, E. M., Vries, E. J., Janssen, D. B. 2002. Efficient recovery of environmental DNA for expression cloning by indirect extraction methods. *FEMS Microbiology Ecology* 44:153-163.
  - Genevaux, P. S. L. 2001. Sulfate-Reducing Bacteria in Human Periodontitis. (tese de doutoramento). (Netherlands): University of Nijmegen, Faculty of Medicine, Department of Preventive Dentistry and Periodontology.
  - Godinho, M., Simões, V. 2005. I&D, Inovação e Empreendedorismo 2007-2013 – Relatório final. Lisboa: Instituto Superior de Economia e Gestão. Technical Report.
  - Goldstein, E. J. C., Citron, D. M., Peraino, V. A., Cross, S. A. 2003. *Desulfovibrio desulfuricans* Bacteremia and Review of Human *Desulfovibrio* Infections. *Journal of Clinical Microbiology* 41(6):2752-2754.
  - Gothwal, R. K., Nigam, V. K., Mohan, M. K., Sasmal, D., Ghosh, P. 2007. Extraction of bulk DNA from Thar Desert soils for optimization of PCR-DGGE based microbial community analysis. *Electronic Journal of Biotechnology* 10(3): 400-408.
  - Gutiérrez, N. C., Camps, J., Hernández, J. M., García, J. L., Prat, E., González, M. B., Miró, R., Miguel, J. F. S. 2003. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization studies in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *The Hematology Journal* 4:67–70.



- Han, X. Y. 2006. Bacterial Identification Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequence Analysis. In: Tang, Y. W., Stratton, C., editors. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Nashville: Springer US. p. 323-332.
- Harvey, B., Soundy, P. 2005. Southern Blotting as a Diagnostic Method. In: Walker M., Rapley R., editors. Medical Biomethods Handbook. Totowa (NJ): Humana Press. p. 35-42.
- Heidelberg, J. F., Seshadri, R., Haveman, S. A. *et al.* 2004. The genome sequence of the anaerobic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Nature Biotechnology 22(5): 554-559.
- Higgins, J. P., Hard, B. C., Mattes, A. 2003. Bioremediation of Acid Rock Drainage Using Sulfate-Reducing Bacteria. In: Proceedings of Sudbury 2003: Mining and Environment; 2003 May 25-28; Ontario. Sudbury: Canadian Land Reclamation Association.
- Hogardt, M., Trebesius, K., Geiger, A. M., Hornef, M., Rosenecker, J., Heesemann, J. 2000. Specific and Rapid Detection by Fluorescent *In Situ* Hybridization of Bacteria in Clinical Samples Obtained from Cystic Fibrosis Patients. Journal of Clinical Microbiology 38(2):818-825.
- Hong, T. 2006. Direct Nucleotide Sequencing for Amplification Product Identification. In: Tang, Y. W., Stratton, C., editors. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Nashville: Springer US. p. 264-275.
- Igen, B., Moosa, S., Harrison, S. T. L. 2006. A Study of the Relative Dominance of Selected Anaerobic Sulfate-Reducing Bacteria in a Continuous Bioreactor by Fluorescence in Situ Hybridization. Microbial Ecology 53:43-52.
- Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação. 2007. Observatório da Criação de Empresas. Resultados do inquérito 2006. Lisboa: IAPMEI – Direcção de Planeamento e Estudos. Relatório 2006.
- Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação (Internet). (actualizado em 2008 Oct 29a). Lisboa: Ministério da Economia e da Inovação; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: <http://www.iapmei.pt/iapmei-mstplindex.php?msid=12>
- Instituto de Apoio às Pequenas e Médias Empresas e à Inovação (Internet). (actualizado em 2008 Oct 29b). Lisboa: Ministério da Economia e da Inovação; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: <http://www.iapmei.pt/iapmei-mstplindex.php?msid=6>

- Instituto de Biologia Molecular e Celular (Internet). (actualizado em 2007). Porto: Instituto de Biologia Molecular e Celular; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: <http://www.ibmc.up.pt/>
- Instituto de Desenvolvimento e Inovação. (Internet). (actualizado em 2007 May). Lisboa: Instituto de Desenvolvimento e Inovação; (visitado 2008 Oct 27). Disponível em: [http://www.empreendedorismo.pt/portal-emp/?l=pt\\_PT&kid=15&aid=67](http://www.empreendedorismo.pt/portal-emp/?l=pt_PT&kid=15&aid=67)
- Instituto de Patologia e Imunologia Molecular (Internet). (actualizado em 2007). Porto: Universidade do Porto; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: <http://www.ipatimup.pt/>
- Instituto para o Desenvolvimento da Gestão Empresarial (Internet). (actualizado em 2008). Lisboa: Instituto Superior de Ciências do Trabalho e da Empresa; (visitado 2008 Oct 27). Disponível em: <http://indeg.iscte.pt/cursos/especializacao/gestao/empreendedorismo/>
- Ito, T., Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y. 2002. Successional Development of Sulfate-Reducing Bacterial Populations and Their Activities in a Wastewater Biofilm Growing under Microaerophilic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(3):1392-1402.
- Janda, J. M., Abbott, S. L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45(9):2761-2764.
- Jan-Roblero, J., Romero, J. M., Amaya, M., Borgne, S. 2004. Phylogenetic characterization of a corrosive consortium isolated from a sour gas pipeline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:862-867.
- Jass, J., Walker, J. T. 2000. Biofilms and biofouling. In: Walker, J. T., Surman, S., Jass, J., editors. *Industrial biofouling - detection, prevention and control*. New York: John Wiley & Sons. p. 1-12.
- Jorge Nascimento Rodrigues (Internet). (actualizado em Nov 2005). Lisboa: Janela na web; (visitado 2008 Oct 27). Disponível em: <http://www.janelanaweb.com/crise/3milhoes.html>
- Jørgensen, B. B. 1982. Mineralization of organic matter in the sea bed - the role of sulfate reduction. *Nature (London)* 296:643-645.
- Jørgensen, B.B., Isaksen, M.F. and Jannasch, H.W. 1992. Bacterial sulfate reduction above 100°C in the deep-sea hydrothermal vent sediments. *Science* 258:1756-1757.

- Jung, H. G., Yoo, J. Y., Woo, J. S. 2003. The Microbiologically Influenced Corrosion Behavior of C–Mn Ship Structural Steel with Different Manufacturing Processes. *ISIJ International* 43(10):1603–1610.
- Karr, E. A., Sattley, W. M., Rice, M. R., Jung, D. O., Madigan, M. T., Achenbach, L.A. 2005. Diversity and Distribution of Sulfate-Reducing Bacteria in Permanently Frozen Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(10):6353-6359.
- Kenzaka, T., Yamaguchi, N., Tani, K., Nasu, M. 1998. rRNA-targeted Fluorescent *In Situ* Hybridization analysis of bacterial community structure in river water. *Microbiol.* 144(8):2085-2093.
- Kjellerup, B. V., Thomsen, T. R., Nielsen, B. H., Olesen, B. H., Frolund, B., Nielsen, P. H. 2005. Microbial diversity in biofilms from corroding heating systems. *Biofouling* 21(1):19-29.
- Knight, I. T. 2000. Molecular Genetic Methods for Detection and Identification of Viable but Nonculturable Microorganisms. In: Colwell, R.R., Grimes, D. J., editors. *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. 1st ed. Washington (DC): American Society for Microbiology. p. 77-87.
- Koch, G. H., Brongers, M. P. H., Thompson, N. G., Virmani, Y. P., Payer, J. H. 2001. *Corrosion Cost and Preventive Strategies in the United States*. Springfield (VA): Federal Highway Administration (FHWA). Technical Report.
- Leite, A., Oliveira, F. 2007. *Empreendedorismo e Novas tendências*. Braga: Edit Value Empresa Júnior, Universidade do Minho.
- Leloup, J., Petit, F., Boust, D., Deloffre, J., Bally, G., Clarisse, O., Quillet, L. 2005. Dynamics of sulfate-reducing microorganisms (*dsrAB* genes) in two contrasting mudflats of the seine estuary (France). *Microbi Ecol.* 50(3):307–314.
- Levsky, J. M., Singer, R. H. 2003. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science* 116(14):2833-2838.
- Li, J., Purdy, K. J., Takii, Hayashi, H. 1998. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulfate-reducing bacteria and sulfate reducing activity in a freshwater lake sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 21(1):31-39.

- Lo, Y. M. D., Chan, K. C. A. 2006a. Introduction to the Polymerase Chain Reaction. In: Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K., Chan, K. C. A., editors. *Methods in Molecular Biology: Clinical Application of PCR*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 1-10.
- Lo, Y. M. D., Chan, K. C. A. 2006b. Setting Up a Polymerase Chain Reaction Laboratory. In: Lo, Y. M. D., Chiu, R. W. K., Chan, K. C. A., editors. *Methods in Molecular Biology: Clinical Application of PCR*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 11-18.
- Loffelholz, M., Deng, H. 2006. PCR and Its Variations. In: Tang, Y. W., Stratton, C., editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Nashville: Springer US. p. 166-183.
- Loubinoux, J., Jaulhac, B., Piemont, Y., Monteil, H., Faou, A. E. 2003. Isolation of Sulfate-Reducing Bacteria from Human Thoracoabdominal Pus. *Journal of Clinical Microbiology* 41(3):1304-1306.
- Loubinoux, J., Valente, F. M. A., Pereira, I. A. C., Costa, A., Grimont, P. A. D., Faou, A. E. 2002. Reclassification of the only species of the genus *Desulfomonas*, *Desulfomonas pigra*, as *Desulfovibrio piger* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:1305-1308.
- Loy, A., Küsel, K., Lehner, A., Drake, H. L., Wagner, M. 2002. Microarray and Functional Gene Analyses of Sulfate-Reducing Prokaryotes in Low-Sulfate, Acidic Fens Reveal Cooccurrence of Recognized Genera and Novel Lineages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):6998–7009.
- Lückner, S., Steger, D., Kjeldsen, K. U., MacGregor, B. J., Wagner, M., Loy, A. 2007. Improved 16S rRNA-targeted probe set for analysis of sulfate-reducing bacteria by fluorescence in situ hybridization. *Journal of Microbiological Methods* 69:523-528.
- Mackay, J. 2007. Introduction to Kinetic (Real-Time) PCR. In: Hilario, E., Mackay, J., editors. *Methods in Molecular Biology: Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 167-176.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997a. Microbial Ecological: Biogeochemical Cycles: Sulfur. In: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., editors. *Brock Biology of microorganisms*. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, International. p. 573-575.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997b. Prokaryotic Diversity: Bacteria: Sulfate- and Sulfur-Reducing Bacteria. In: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.,

- editors. Brock Biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, International. p. 671-674.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997c. Metabolic Diversity among the Microorganisms: Sulfate Reduction. In: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., editors. Brock Biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, International. p. 505-508.
  - Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1997d. Macromolecules and Molecular Genetics: DNA Structure. In: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., editors. Brock Biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, International. p. 181-194.
  - Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. 1997e. Microbial Evolution, Systematics and Taxonomy: Evolutionary Chronometers. In: Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., editors. Brock Biology of microorganisms. 8th ed. New Jersey: Prentice-Hall, International. p. 617-618.
  - Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. Brock Biology of microorganisms (Internet). New Jersey: Prentice-Hall, International; 1997 (visitado 2008 October 11). Disponível em: <http://cwx.prenhall.com/bookbind/pubbooks/brock/chapter14/deluxe.html>
  - Magalhães, C. M. 2007. Durabilidade, Corrosão e protecção em fundações metálicas (dissertação). (Minas Gerais): Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Engenharia de Materiais e Construção, Escola de Engenharia Curso de Especialização em Construção Civil.
  - Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K. H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. Syst Appl Microbiol. 15(4):593–600.
  - Mascia, L. S. V. 2003. Curso de Tratamento de Águas. Caxias do Sul: Indústria Química Mascia Ltda. Technical Report.
  - Meays, C. L., Broersma, K., Nordin, R., Mazumder, A. 2004. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. Journal of Environmental Management 73:71–79.
  - Mestrado em Inovação e Empreendedorismo Tecnológico (Internet). (actualizado em 2008 Aug 11). Porto: Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto; (visitado 2008 Oct 27). Disponível em: <http://paginas.fe.up.pt/miete/index.php>

- Ministério da Saúde. 2002. Decreto-Lei n.º 121/2002 de 3 de Maio. Diário da República — I SÉRIE-A, n.º 102.
- MoBio Laboratories, Inc. 2008a. PowerSoil™ Soil DNA Isolation Kit - Instruction Manual. Loker Ave West, Carlsbad: MoBio Laboratories.
- MoBio Laboratories, Inc. 2008b. UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit - Instruction Manual. Loker Ave West, Carlsbad: MoBio Laboratories.
- Muyzer, G., Stams, A. J. M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 6:441-454.
- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., Jannasch, H. W.. 1995. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol.* 164:165–172.
- Muyzer, G., Waal, E. C., Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(3):695-700.
- National Center for Biotechnology Information (Internet). (atualizado em 2008 July 23). United States: National Library of Medicine; (visitado 2008 October 11). Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list\\_uids=329](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=329)
- Neretin, L. N., Schippers, A., Pernthaler, A., Hamann, K., Amann, R. Jørgensen, B. B. 2003. Quantification of dissimilatory (bi)sulphite reductase gene expression in *Desulfobacterium autotrophicum* using real-time RT-PCR. *Environ Microbiol.* 5(8):660–671.
- Okada, H., Dobashi, M., Yamazaki, T., Fujisawa, M., Arakawa, S., Kamidono, S. 2001. Fluorescence *In Situ* Hybridization Analysis of Sex-Chromosome Mosaicism in Azoospermic Men. *Journal of Andrology* 22(6):970-972.
- Pack, S. D., Zhuang, Z. 2000. Fluorescence *In Situ* Hybridization: Application in Cancer Research and Clinical Diagnostics. In: Powell, S. M., editor. *Methods in Molecular Medicine: Colorectal Cancer: Methods and Protocols*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 35-50.

- Pereira, M. O. B. O. 2001. Comparação da eficácia de dois biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em sistemas de biofilme (Tese de Doutorado). (Braga): Universidade do Minho, Departamento de Engenharia Biológica.
- Peres, F. A. S. 2006. Tratamento de águas de resfriamento com peróxido de hidrogénio (Tese de Mestrado). (Rio de Janeiro): PUC, Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia.
- Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W., Amann, R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In: Paul, J., editor. *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*. London: Academic Press, Lda. p. 207-226.
- Pernthaler, J. Pernthaler, A., Amann, R. 2003. Automated Enumeration of Groups of Marine Picoplankton after Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(5):2631-2637.
- Peters, D. M. 2000. Technology Transfer – Editorial. *Welding Design Fabrication* Nov. 2000.
- Pimenta, G., Pépe, N. 2003. Corrosão induzida por microrganismos em aços inoxidáveis austeníticos AISI 304/316 aplicados em sistemas de distribuição de água. In: *Symposium New Trends in Molecular Electrochemistry e XII Meeting of the Portuguese Electrochemical Society*; 2003 Sept 16-20; Lisboa: Academia de Ciências.
- Pires, E. S., Teixeira, K. R. S. 2004. Construção de bibliotecas de genes para 16S rRNA a partir de amostras ambientais. *Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida* 24(2):41-45.
- Podzorski, R. P., Loeffelholz, M., Hayden, R. T. 2006. Detection and Characterization of Molecular Amplification Products: Agarose Gel Electrophoresis, Southern Blot Hybridization, Restriction Enzyme Digest Analysis, and Enzyme-Linked Immunoassay. In: Tang, Y. W., Stratton, C., editors. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Nashville: Springer US. p. 243-263.
- Porter, M. E. 1998. Clusters and the New Economics of Competition. *Harvard Business Review* 76:77-90.
- Porter, M. E., Schwab, K. 2008. *The Global Competitiveness Report 2008-2009*. Geneva: World Economic Forum. Technical Report.
- Power, C., Feldner, R., Scanlon, B., Frischer, M., Richardson, J. 2007. Bacterial Source Tracking in the Vernon River Watershed. In: *Proceedings of the 2007 Georgia Water Resources Conference*; 2007 March 27–29; Georgia: University of Georgia.

- Presidência do Conselho de Ministros. 2005. Programa do XVII Governo Constitucional. Lisboa.
- Qin, X. 2006. Diagnostic Microbiology Using Real-Time PCR Based on FRET Technology. In: Tang, Y. W., Stratton, C., editors. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. Nashville: Springer US. p. 291-305.
- Rajasekar, A., Ponmariappan, S., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N. 2007. Bacterial Degradation and Corrosion of Naphtha in Transporting Pipeline. *Curr. Microbiol.* 55:374-381.
- Rao, T. S., Sairam, T. N., Viswanathan, B., Nair, K. V. K. 2000. Carbon steel corrosion by iron oxidising and sulphate reducing bacteria in a freshwater cooling system. *Corrosion Science* 42:1417-1431.
- Reynolds, P., Camp, S. M., Bygrave W., Autio, E., Hay, M. 2001. Global Entrepreneurship Monitor: 2001 Summary Report. London: London Business School and Babson College. Technical Report.
- Rooney-Varga, J. N., Devereux, R., Evans, R. S., Hines, M. E. 1997. Seasonal Changes in the Relative Abundance of Uncultivated Sulfate-Reducing Bacteria in a Salt Marsh Sediment and in the Rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(10):3895-3901.
- Sass, H., Cypionka, H., Babenzien, H. D. 1996. Vertical distribution of sulfate-reducing bacteria at the oxic-anoxic interface in sediments of the oligotrophic Lake Stechlin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22(3):245-255.
- Schumpeter, J. A. 1942. Capitalism, socialism and democracy. New York: Harper and Brothers.
- Silva, P. 2007. Manual do Empreendedor. Leiria: Gabinete de Projectos do Instituto Politécnico de Leiria.
- Smits, T. H., Devenoges, C., Szyński, K., Maillard, J., Holliger, C. 2004. Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *J Microbiol Methods* 57(3):369–378.
- Sociedade Portuguesa de Inovação. 2005. Estudo de Avaliação do Potencial Empreendedor em Portugal em 2004 – Projecto GEM Portugal 2004. Porto: Sociedade Portuguesa de Inovação. Technical Report.



- Stackebrandt, E., Embley, M. 2000. Diversity of Uncultured Microorganisms in the Environment. In: Colwell, R.R., Grimes, D. J., editors. Nonculturable Microorganisms in the Environment. 1st ed. Washington (DC): American Society for Microbiology. p. 57-77.
- Sun, B., Cole, J. R., Tiedje, J. M. 2001. *Desulfomonile limimaris* sp. nov., an anaerobic dehalogenating bacterium from marine sediments. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:365-371.
- Tate, B. A., Ostroff, R. L. 2002. Fluorescence *in situ* Hybridization. In: Zigova, T., Sanberg, P. R., Ramos, J. R. S., editors. Methods in Molecular Biology: Neural Stem Cells: Methods and Protocols. Totowa (NJ): Humana Press. p. 189-194.
- Tourova, T. P. 2003. Copy number of ribosomal operons in prokaryotes and its effect on phylogenetic analysis. Microbiology. 72(4):437–452.
- UMIC – Agência para a Sociedade do Conhecimento, IP (Internet). (actualizado em 2008 April 9). Porto Salvo: Ministério da Ciência, Tecnologia e do Ensino Superior; (visitado 2008 Nov 2). Disponível em: [http://www.unic.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=2956&Itemid=397](http://www.unic.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=2956&Itemid=397)
- Unidade de Coordenação do Plano Tecnológico. 2005. Documentos que fundamentaram a elaboração Plano Tecnológico: Transferência de Tecnologia. Lisboa: Unidade de Coordenação do Plano Tecnológico.
- Videira, A. 2001a. Reacção em cadeia da polimerase (PCR). In: Videira, A., editor. Engenharia Genética. Princípios e aplicações. 1st ed. Lidel. p. 67-70.
- Videira, A. 2001b. Alguma metodologia de análise dos genes e dos seus produtos. In: Videira, A., editor. Engenharia Genética. Princípios e aplicações. 1st ed. Lidel. p. 47-66.
- Videla, H. A., Herrera, L. K. 2005. Microbiologically influenced corrosion: looking to the future. Int. Microbiol. 8:169-180.
- Videla, H. A., Wilkes, J. F. Manual of Biocorrosion (Internet). CRC Lewis Publishers; 1997 (cited 2008 October 11). Available from: [http://books.google.com/books?id=xJZdbyQt8-UC&printsec=frontcover&source=gb\\_summary\\_r&cad=0#PPP15,M1](http://books.google.com/books?id=xJZdbyQt8-UC&printsec=frontcover&source=gb_summary_r&cad=0#PPP15,M1)
- Vossen, 2001. Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis. Human and Clinical Genetics (LUMC) - LabJ\_Protocols.

- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., Schleifer, K. H. 1993. Probing Activated Sludge with Oligonucleotides Specific for Proteobacteria: Inadequacy of Culture-Dependent Methods for Describing Microbial Community Structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(5):1520-1525.
- Wagner, M., Roger, A. J., Flax, J. L., Brusseau, G. A., Stahl, D. A. 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* 180(11):2975–2982.
- Xavier, J. B., Picioreanu, C., Almeida, J. S., Loosdrecht, M. C. M. 2003. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia* 76:2-13.
- Yang, X. J. 2000. *In Situ* Hybridization. In: Rakoczy, P. E., editor. *Methods in Molecular Medicine: Vision Research Protocols*. Totowa (NJ): Humana Press. p. 145-69.
- Zhu, X. Y., Lubeck, J., Kilbane II, J. J. 2003. Characterization of Microbial Communities in Gas Industry Pipelines. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9):5354-5363.